

**PHYTO-ESTROGENE:
MOLEKULARTOXIKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZU
MECHANISMEN DER CHEMOPRÄVENTION
DURCH ISOFLAVONE UND LIGNANE
AN HUMANEN BRUSTZELLINIEN**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. troph. Claudia Steiner
geboren am 30.11.1976 in Eisenach

Dekan: Prof. Dr. Jochen Lehmann

1. Gutachter: Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Jahreis

3. Gutachter: Prof. Dr. Sabine E. Kulling

Datum der Disputation: 18.04.2006

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforderliche
erforscht zu haben, und das Unerforderliche ruhig zu verehren.

(Johann Wolfgang von Goethe)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 ERNÄHRUNG UND KREBS	1
1.2 MAMMAKARZINOGENESE	1
1.2.1 Aufbau und Entwicklung der Brustdrüse	1
1.2.2 Tumorigenese	2
1.2.3 Ätiologie des Mammakarzinoms	4
1.2.3.1 Risikofaktoren	4
1.2.3.2 Protektive Faktoren	8
1.2.4 Epidemiologie des Mammakarzinoms	9
1.3 PHYTOESTROGENE	11
1.3.1 Einteilung, Vorkommen und Gehalte in Lebensmitteln	11
1.3.2 Bioverfügbarkeit	13
1.3.2.1 Aufnahme und Resorption	13
1.3.2.2 Metabolismus	14
1.3.2.3 Verteilung in periphere Gewebe	16
1.3.2.4 Ausscheidung	16
1.3.2.5 Pharmakokinetik	17
1.3.2.6 Inter-individuelle Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der Phytoestrogene	19
1.3.3 Physiologische Wirkungen von Phytoestrogenen	20
1.4 CHEMOPRÄVENTION	23
1.5 ZELLULÄRE ENTGIFTUNGSSYSTEME	24
1.5.1 Glutathion S-Transferasen	24
1.5.1.1 Einteilung und Nomenklatur	24
1.5.1.2 Gewebsspezifische Expression	25
1.5.1.3 Biotransformationsreaktionen	25
1.5.1.4 Regulation und Induzierbarkeit der Glutathion S-Transferasen	26
1.5.2 NAD(P)H: Quinon Oxidoreduktase	27
1.5.2.1 Einteilung und Nomenklatur	27
1.5.2.2 Gewebsspezifische Expression	27
1.5.2.3 Biotransformationsreaktionen	28
1.5.2.4 Regulation und Induzierbarkeit der NAP(P)H: Quinon Oxidoreduktase	28
2 PROBLEM- UND AUFGABENSTELLUNG	30
3 MATERIAL UND METHODEN	32
3.1 MATERIALIEN	32
3.1.1 Humane Mammazellmodelle	32

3.1.2	Testsubstanzen	32
3.1.3	Sonstiges	34
3.2	METHODEN	34
3.2.1	Zellbiologische Techniken	34
3.2.1.1	Zellkultur	34
3.2.1.2	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	35
3.2.1.3	Epithelzellnachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz	36
3.2.1.4	Karyotypisierung der MCF-10A und MCF-7 Zellen mittels 24-Farben-FISH	36
3.2.1.5	Wachstumskinetik	37
3.2.1.6	Zellproliferationstests	37
3.2.1.6.1	DNA-Färbung mittels DAPI	37
3.2.1.6.2	Bestimmung der DNA-Syntheseleistung	38
3.2.1.7	Bestimmung der metabolischen Aktivität	38
3.2.1.7.1	Bestimmung der mitochondrialen Aktivität	38
3.2.1.7.2	Bestimmung der zellulären metabolischen Aktivität	39
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	39
3.2.2.1	Bestimmung der steady-state mRNA Expression der GST-Isoenzyme	39
3.2.2.1.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen	39
3.2.2.1.2	Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes	40
3.2.2.1.3	Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.2.1.4	Semiquantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	40
3.2.2.1.5	Gelelektrophorese und Auswertung	42
3.2.2.2	Genotypisierung der Mamma-Zelllinien	42
3.2.2.2.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus den Zellen	42
3.2.2.2.2	Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes	42
3.2.2.2.3	Multiplex-PCR für hGSTM1, hGSTT1 und β -Globin	42
3.2.2.2.4	RFLP-PCR zum Nachweis des hGSTP1-Genotypes	43
3.2.2.2.5	Gelelektrophorese und Auswertung	43
3.2.2.3	cDNA Arraytechnik zur Untersuchung der Genexpression von Biotransformations- und Stress Response-Enzymen in MCF-10A und MCF-7 Zellen	43
3.2.2.3.1	In vitro Transkription und Dot-Blot	44
3.2.2.3.2	Hybridisierung und Detektion	44
3.2.2.3.3	Auswertung	44
3.2.2.4	Quantitative real-time RT-PCR zur Bestimmung der hGSTP1, hGSTA4 und hNQO1 mRNA Expression	44
3.2.2.4.1	Inkubation der Zellen mit Genistein und Isolierung der Gesamt-RNA	45
3.2.2.4.2	Reverse Transkription	45
3.2.2.4.3	Sequenzierung der GSTP1, GSTA4 und NQO1 PCR-Produkte	45
3.2.2.4.4	Quantitative real-time RT-PCR	46
3.2.2.4.5	Auswertung	46
3.2.3	Biochemische Techniken	47

3.2.3.1	Inkubation mit Phytoestrogenen	47
3.2.3.2	Isolierung von Gesamt-Proteinen aus den Zellen	47
3.2.3.3	Proteinbestimmung nach BRADFORD	47
3.2.3.4	Western Blot der GST-Isoenzyme und NQO1	48
3.2.3.5	Bestimmung der GST-Gesamtaktivität	49
3.2.3.6	Bestimmung des intrazellulären Glutathion-Status	50
3.2.3.7	Bestimmung der NQO-Aktivität	51
3.2.4	Genotoxizitätstests	51
3.2.4.1	Prinzip der Einzelzellmikrogelelektrophorese	52
3.2.4.2	Dosis-Wirkungs-Beziehungen	52
3.2.4.3	Reparaturversuche	53
3.2.4.4	Challenge-Assay	53
3.2.5	Analytik: Bestimmung der zellulären Aufnahme von Genistein	53
3.2.6	Statistische Auswertung	54
4	ERGEBNISSE	56
4.1	BEWERTUNG DER SENSITIVITÄT HUMANER MAMMAZELLEN GEGENÜBER FÜR DIE MAMMAKARZINO- GENESE BEDEUTENDEN PROTEKTIVEN FAKTOREN UND AUSGEWÄHLTEN RISIKOFAKTOREN	56
4.1.1	Charakterisierung der humanen Mammazelllinien	56
4.1.1.1	Nachweis des epithelialen Ursprungs	56
4.1.1.2	Karyotypisierung der Mammazellen	57
4.1.1.3	Wachstumskinetik und Ermittlung der Generationszeit	58
4.1.2	Untersuchungen zur Phytoestrogen-Wirkung in Mammazellen unterschiedlichen Transformationsgrades	59
4.1.2.1	Modulation des DNA-Gehaltes als Maß für die Zellzahl	59
4.1.2.2	Modulation der DNA-Syntheserate	63
4.1.2.3	Modulation der metabolischen Aktivität	63
4.1.3	Untersuchungen zur Genotoxizität potenzieller Brustkrebs-Risikofaktoren in humanen Mammazellen	66
4.2	DIFFERENZIELLE EXPRESSION FREMDSTOFF-METABOLISIERENDER UND OXIDATIVER STRESS- ASSOZIIERTER ENZYMSYSTEME	70
4.2.1	Differenzielle Genexpression	70
4.2.2	Status des Glutathion / Glutathion S-Transferasen Systems in humanen Mammazellen	71
4.2.3	Status der NAD(P)H: Quinonoxido-reduktase in humanen Mammazellen	73
4.3	MODULATION FREMDSTOFF-METABOLISIERENDER UND OXIDATIVER STRESS-ASSOZIIERTER ENZYMSYSTEME DURCH PHYTOESTROGENE IN HUMANEN MAMMAZELLEN	74
4.3.1	Modulation der differenziellen Genexpression durch GEN	74
4.3.2	Induzierbarkeit des Glutathion/Glutathion S-Transferasen Systems	76
4.3.3	Induzierbarkeit der NAD(P)H: Quinonoxido-reduktase	80
4.4	EINFLUSS DER PHASE II-ENZYMINDUKTION AUF DIE GENOTOXIZITÄT	83
4.4.1	Auswirkungen auf die Genotoxizität von HNE und BPDE	83
4.4.2	Auswirkungen auf die Genotoxizität von Menadion	84

4.5	ZELLULÄRE AUFNAHME VON GENISTEIN IN HUMANE MAMMAZELLEN	85
5	DISKUSSION.....	87
5.1	UNTERSCHIEDE IN DER SENSITIVITÄT DER ZELLINIEN GEGENÜBER BRUSTKREBS-RELEVANTEN SCHUTZ- UND RISIKOFAKTOREN.....	87
5.1.1	Phytoestrogene wirken Nicht-estrogen in MCF-10A und MCF-7 Zellen sowie estrogen in MCF-7 Zellen	88
5.1.2	MCF-7 Zellen reagieren sensibler auf DNA-schädigende Substanzen als MCF-10A	91
5.2	EXPRESSIONSMUSTER ENDOGENER SCHUTZSYSTEME IN NORMALEN UND TRANSFORMIERTEN MAMMAZELLEN.....	94
5.3	EINFLUSS VON PHYTOESTROGENEN AUF DIE EXPRESSION VON FREMDSTOFFMETABOLISMUS- BZW. OXIDATIVER STRESS-ASSOZIIERTEN ENZYMSYSTEMEN IN MAMMAZELLEN.....	97
5.3.1	Differenzielle Genexpression in Brustzellen – cDNA-Array Screening	97
5.3.2	Modulation von Phase II-Enzymsystemen in Mammaryzelllinien	99
5.3.2.1	Genistein induziert das Glutathion/Glutathion S-Transferase-System	99
5.3.2.2	Genistein induziert das NQO1 Enzymsystem.....	101
5.3.2.3	Mögliche Regulationsmechanismen der Phase II-Enzymexpression.....	103
5.4	GENISTEIN WIRKT ANTIGENOTOXISCH GEGEN BRUSTKREBS-ASSOZIIERTE KARZINOGENE IN NICHT- TRANSFORMIERTEN BRUSTZELLEN	105
5.5	MCF-10A ZELLEN WEISEN HÖHERE INTRAZELLULÄRE GENISTEINKONZENTRATIONEN AUF	110
6	ZUSAMMENGEFASSTE ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN	113
7	AUSBLICK.....	117
8	ZUSAMMENFASSUNG	118
ANHANG I: CHEMIKALIEN, GERÄTE, LÖSUNGEN UND PUFFER.....		XXXV
ANHANG II: TABELLEN UND ABBILDUNGEN		XLIV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Feinbau der weiblichen Brustdrüse	2
Abbildung 1.2: Modell der Brustkrebsentstehung nach Feigelson <i>et al.</i> [11]	3
Abbildung 1.3: Estrogene als Karzinogene	5
Abbildung 1.4: Darstellung ausgewählter Brustkrebs-Risikofaktoren (Estrogene, PAK, Lipidperoxidations- produkte) mit ihren Aktivierungs- und Entgiftungswegen	6
Abbildung 1.5: Internationaler Vergleich der Brustkrebs-Mortalitätsraten (pro 100.000 Einwohner) (links) und der Isoflavon-Aufnahme (mg pro Tag) (rechts)	10
Abbildung 1.6: Strukturklassen der Phytoestrogene im Vergleich zu Estrogenen	11
Abbildung 1.7: Metabolismus der Pflanzenlignane in die Säugerlignane	14
Abbildung 1.8: Reduktiver Metabolismus von Daidzein und Genistein	15
Abbildung 1.9: GST-vermittelte Entgiftung von (1) BPDE und (2) HNE (nach [216;217])	26
Abbildung 1.10: Struktur des <i>hGSTP1</i> und <i>hGSTA4</i> Promoters (nach [233;234])	27
Abbildung 1.11: Struktur des <i>hNQO1</i> Promoters (nach [256;257])	29
Abbildung 3.1: Morphologie der (A) MCF-10A und (B) MCF-7 Mammazelllinien (5x Vergrößerung)	32
Abbildung 3.2: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz	36
Abbildung 3.3: Prinzip der TaqMan Detektion	45
Abbildung 3.4: Prinzip der NQO Aktivitätsbestimmung	51
Abbildung 3.5 Übersicht der in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen unter Angabe der verwendeten Methoden	55
Abbildung 4.1: Indirekte Immunfluoreszenz von Ep-CAM- bzw. Thy-1 (CD90)-Antigen in MCF-10A, MCF-7 und primären Kolonfibroblasten.	57
Abbildung 4.2: Wachstumskinetik der MCF-10A und MCF-7 Mammazelllinie	58
Abbildung 4.3: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit GEN und dessen bakteriellen Metaboliten nach 48 h	60
Abbildung 4.4: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit DAI und dessen bakteriellen Metaboliten nach 48 h	60
Abbildung 4.5: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit Mix(EQU) im Vergleich zu den isolierten Isoflavonen nach 48 h	61
Abbildung 4.6: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit ENL und END nach 48 h	62
Abbildung 4.7: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit Estrogenen nach 48 h	62
Abbildung 4.8: Mitochondriale Enzymaktivität in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit E2 nach 48 h	64
Abbildung 4.9: Mitochondriale Enzymaktivität in MCF-10A nach Inkubation mit Isoflavonen nach 48 h	64
Abbildung 4.10: Darstellung der additiven Wirkung der Isoflavon-Kombination Mix(EQU) auf die mitochondriale Aktivität in MCF-10A Zellen nach 48 h	65
Abbildung 4.11: Induktion von DNA-Strangbrüchen in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit (A) E2 und 4-OH-E2 (2 h), (B) Menadion (30 min), (C) H ₂ O ₂ (5 min), (D) HNE (30 min), (E) B(a)P (30 min), (F) BPDE (30 min)	68

Abbildung 4.12: Reparatur von H ₂ O ₂ -induzierten DNA-Schäden in MCF-7 (0-120 min Reparatur).....	69
Abbildung 4.13: Expressionsmuster antioxidativer und Phase II-Enzymsysteme in MCF-10A und MCF-7	71
Abbildung 4.14: Induktion der GST-Aktivität auf der Basis der Zellzahl in MCF-10A und MCF-7 nach 48- stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2	76
Abbildung 4.15: Modulation des zytosolischen Proteingehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2	77
Abbildung 4.16: Modulation der hGSTP1-1 Protein-expression auf der Basis der Zellzahl in MCF-10A nach 48- stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2	78
Abbildung 4.17: Korrelation zwischen hGSTP1-1 Protein und GST-Aktivität in MCF-10A Zellen nach 48- stündiger Inkubation mit 30 µM GEN.....	78
Abbildung 4.18: Modulation der <i>hGSTP1</i> mRNA-Expression bezogen auf <i>β-Aktin</i> mRNA in MCF-10A nach 8-, 24- und 48-stündiger GEN-Behandlung	79
Abbildung 4.19: Modulation der <i>hGSTA4</i> mRNA-Expression bezogen auf <i>β-Aktin</i> mRNA in MCF-10A und MCF-7 nach 8-, 24- und 48-stündiger GEN-Behandlung	79
Abbildung 4.20: Modulation des intrazellulären GSH-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2	80
Abbildung 4.21: Induktion der NQO-Aktivität in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2.....	80
Abbildung 4.22: Modulation der hNQO1-1 Proteinexpression in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2	81
Abbildung 4.23: Korrelation zwischen hNQO1-1 Protein und NQO-Aktivität in MCF-10A Zellen nach 48- stündiger Inkubation mit 30 µM GEN.....	81
Abbildung 4.24: Modulation der <i>hNQO1</i> mRNA-Expression bezogen auf <i>β-Aktin</i> mRNA in MCF-10A und MCF- 7 nach 8-, 24- und 48-stündiger GEN-Behandlung	82
Abbildung 4.25: Effekte einer 48-stündigen Vorinkubation mit GEN und nachfolgender Behandlung mit HNE und BPDE (30 min) auf die DNA-Integrität von MCF-10A und MCF-7 Zellen	84
Abbildung 4.26: Effekte einer 48-stündigen Vorinkubation mit GEN und nachfolgender Behandlung mit Menadion (30 min) auf die DNA-Integrität von MCF-10A und MCF-7 Zellen	85
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Regulation der Genexpression und Induktion von <i>hGSTA4</i> , <i>hGSTP1</i> und <i>hNQO1</i> nach [216;253;255;321;374;375;377;378].....	104
Abbildung 9.1: Karyogramm der MCF-10A Zelllinie	XLVI
Abbildung 9.2: Karyogramm der MCF-7 Zelllinie	XLVI
Abbildung 9.3: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit EQU und S-EQU nach 48 h und 72 h	XLIX
Abbildung 9.4: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-7 nach Inkubation mit GEN, DAI, ENL und END in FCS-haltigen Medium nach 48 h.....	XLIX
Abbildung 9.5: BrdU-Einbau als Maß für die DNA-Synthese in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit GEN, EQU und E2 nach 48 h.....	L
Abbildung 9.6: Mitochondriale Aktivität in MCF-7 nach Inkubation mit Isoflavonen und Mix(EQU) nach 48 hLI	
Abbildung 9.7: Induktion von DNA-Schäden in MCF-7 Zellen nach Inkubation mit E2 nach 1 h, 4 h, 24 h	LII

Abbildung 9.8: PCR-Analyse zum Nachweis der Basalexpression der zytosolischen GSTs in MCF-10A und MCF-7	LIII
Abbildung 9.9: PCR-Analyse zum Nachweis des <i>hGSTM1</i> und <i>hGSTT1</i>	LIII
Abbildung 9.10: Restriktionsanalyse eines PCR-amplifizierten DNA-Fragments des <i>hGSTP1</i> Gens.....	LIV
Abbildung 9.11: Beispielblots für den biochemischen Nachweis der Isoenzyme hGSTA1/2, hGSTA4-4, hGSTM1/2, hGSTP1-1 in MCF-10A und MCF-7.....	LIV
Abbildung 9.12: Induktion der GST-Aktivität auf der Basis des zytosolischen Proteingehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2.....	LV
Abbildung 9.13: Modulation der hGSTP1-1 Proteinexpression auf der Basis des zytosolischen Proteingehaltes in MCF-10A nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2.....	LV
Abbildung 9.14: Modulation der hGSTA4-4 Proteinexpression in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2.....	LVI

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Phytoestrogen-Gehalt in Lebensmitteln (mg/100g) (aus [76;89;90]).....	12
Tabelle 1.2: Pharmakokinetik von Phytoestrogenen.....	18
Tabelle 3.1: Herstellung der verwendeten Isoflavon- und Lignan-Stammlösungen	33
Tabelle 3.2: Herstellung der Lösungen der verwendeten kanzerogenen Substanzen.....	33
Tabelle 3.3: Konzentrationsbereiche der verwendeten Testsubstanzen	34
Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Mastermixes (1x Ansatz) für die RT-PCR.....	41
Tabelle 3.5: PCR-Bedingungen für GST-Isoenzyme und β -Aktin	41
Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Mastermixes (1x Ansatz) für die Multiplex-PCR	43
Tabelle 3.7: PCR-Bedingungen für die Multiplex-PCR.....	43
Tabelle 3.8: Zusammensetzung des Mastermixes (1x Ansatz) für die real-time RT-PCR.....	46
Tabelle 3.9: Aufgetragene Proteinmengen zum Nachweis der GST-Isoenzyme und NQO1	49
Tabelle 3.10: Besonderheiten der Immunodetektion.....	49
Tabelle 3.11: Inkubationsbedingungen der Testsubstanzen im Comet-Assay	52
Tabelle 3.12: Inkubationsbedingungen der Testsubstanzen im Challenge-Assay.....	53
Tabelle 4.1: Ermittelte EC_{50} -Konzentrationen (μ M) für die Testsubstanzen in MCF-10A und MCF-7 Zellen....	63
Tabelle 4.2: Zelluläre metabolische Aktivität in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit GEN, EQU und E2 nach 48 h.....	65
Tabelle 4.3: Differenziell exprimierte Gene in MCF-10A und MCF-7	70
Tabelle 4.4: Basale mRNA-Expression der humanen GST-Isoenzyme.....	72
Tabelle 4.5: Quantifizierung der Parameter des GSH/GST-Systems in MCF-10A und MCF-7.....	73
Tabelle 4.6: Signifikant modulierte Gene in MCF-10A und MCF-7 nach 24-stündiger Inkubation mit GEN und E2.....	75
Tabelle 4.7: Zelluläre Aufnahme von GEN (1 μ M, 10 μ M) und der Anteil an GEN in den Membranen nach 1 h und 24 h Behandlung der MCF-10A und MCF-7 Mammazellen.	86
Tabelle 5.1: Aktivitäten humaner GSTs gegenüber HNE, BPDE und CDNB	107
Tabelle 9.1: Verwendete GST Primersequenzen und ihre Produktgröße.....	XLIV
Tabelle 9.2: Primersequenzen zum Nachweis des <i>hGSTM1</i> - und <i>hGSTT1</i> -Genotypes	XLIV
Tabelle 9.3: Primersequenzen zum Nachweis des <i>hGSTP1</i> Polymorphismus	XLIV
Tabelle 9.4: Übersicht der auf den cDNA Arrays enthaltenen Gengruppen	XLV
Tabelle 9.5: Verwendete Primersequenzen für die real-time RT-PCR	XLV
Tabelle 9.6: Signifikante Modulation des Brustzellwachstums (DAPI)	XLVII
Tabelle 9.7: Ermittelte EC_{50} -Konzentrationen (μ M) für die Testsubstanzen in MCF-10A und MCF-7 Zellen	XLVIII
Tabelle 9.8: Signifikante Modulation des Brustzellwachstums (BrdU).....	L

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere	ECF	Enhanced Chemifluorescence
ABC	ATP-Binding Cassette	ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>ADH II</i>	Alkohol-Dehydrogenase Klasse II	EGF	Epidermal Growth Factor
AK	Antikörper	END	Enterodiol
AP	Alkalische Phosphatase	ENL	Enterolacton
AP-1	Aktivator Protein 1	ER	Estrogen-Rezeptor
ARE	Antioxidant Response Element	ERE	Estrogene Response Element
<i>ATM</i>	Ataxia Telangiectasia mutated-Gen	ERK 1/2	Extrazellulär regulierte Proteinkinase 1/2
ATP	AdenosinTriPhosphat	EQU	Equol
bp	Basenpaar(e)		
B(a)P	Benzo(a)pyren	FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
BITC	Benzylisothiocyanat	FCS	Fetales Kälberserum
BHA	Butylhydroxyanisol	FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
t-BHQ	<i>tert</i> -Butylhydroquinon	g	G-Zahl (Einheit der Relativen Zentrifugationsbeschleunigung)
BPDE	Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<i>BRCA1, BRCA2</i>	Breast Cancer 1 Gene, Breast Cancer 2 Gene	GEN	Genistein
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridine	Glc 6-P	Glukose 6-Phosphat
BSA	Rinder Serumalbumin	GSH	Glutathion
Caco-2	humane Kolonadenokarzinomzelllinie	GST	Glutathion S-Transferase(n)
CCS	Charcoal-stripped Fetales Kälberserum	h	Stunde
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	HAA	Heterozyklisch Aromatische Amine
CO ₂	Kohlendioxid	<i>HER2</i>	Human Epithelial Growth factor Receptor 2 (erbB2)
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase(n)	hGST	humane GST
DAB	Diaminobenzidin	HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
DAI	Daidzein	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
DAPI	4',6'-diamidino-2'-phenylindole hydrochloride	HRP	Meerrettichperoxidase
dd H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser	IGF-I	Insulin-like Growth Factor I
DHGEN	Dihydrogenistein	JNK	c-jun N-terminale Kinase
DHDAI	Dihydrodaidzein	kD	Kilodalton
DIG	Digoxigenin	LMA	Low-Melting Agarose
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	M	molar (mol/l)
DMPC	Dimethylpyrocarbonat	MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid	MAT	Matairesinol
DNase	Desoxyribonuklease	MDR	Multidrug Resistance Protein
dNTP	Desoxyribonukleotid	min	Minute
DTT	Dithiothreitol	MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
E2	17β-Estradiol	mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
EC ₅₀	Halbmaximale Wirkstoffkonzentration (50 % Wachstum)	MRP	Multidrug Resistance Associated Protein

MS	Massenspektrometer	RNAse	Ribonuklease
MT	Metallothioneine	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
MTP	Mikrotiterplatte	RPL13A	Ribosomales Protein L13a
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5 diphenyltetrazolium bromide	RT	Raumtemperatur
MW	Mittelwert	RT-PCR	Reverse Transkriptions – PCR
n	Anzahl der Versuchswiederholungen	S-EQU	S-Equol
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat	SD	Standardabweichung
NF- κ B	Nuklearer Faktor kappa	SDS	Natriumdodecylsulfat
NMA	Normal-Melting Agarose	sec	Sekunde
NQO1	NAD(P)H: Quinonoxido-reduktase	SECO	Secoisolariciresinol
NRH	Dihyronicotinamid-Ribosid	SHBG	Steroidhormon-bindendes Globulin
OT	Objektträger	SULT	Sulfotransferase(n)
<i>O</i> -DMA	<i>O</i> -Demethylangolensin	TAE	Tris-Acetat EDTA
2-OH-E1	2-Hydroxy-Estron	TBS	Tris-gepufferte Saline
2-OH-E2	2-Hydroxy-Estradiol	TBST	TBS + Tween
4-OH-E2	4-Hydroxy-Estradiol	TEMED	Tetramethylethylendiamin
6-OH- <i>O</i> -DMA	6-Hydroxy- <i>O</i> -Demethylangolensin	TI	Tail Intensity
8-oxo-dG	8-Oxo-Guanin	<i>TP53</i>	Tumorprotein 53
p38	Mitogen aktivierte Proteinkinase p38	Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl- propan-1,3-diol
p53	Tumorsuppressorprotein	TRE	TPA-responsives Element
Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	UGT	UDP-Glucuronosyltransferase(n)
PAK	Polyzyklisch Aromatische Kohlenwasserstoffe	V79	Chinesische Hamster Lungenfibroblasten- Zelllinie
PBS	Phosphat-gepufferte Saline	v/v	Volumen pro Volumen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	VF	Verdünnungsfaktor
PEITC	Phenethylisothiocyanat	w/v	Gewicht pro Volumen
PPIA	Peptidylprolyl-Isomerase A	ZZ	Zellzahl
r	Korrelationskoeffizient (Pearson)		
RFLP-PCR	Restriktionsfragment-Längenpolymor- phismus-PCR		

1 EINLEITUNG

Die Bedeutung sekundärer Pflanzenstoffe aus der Ernährung für die Krankheitsprävention nimmt stetig zu. Dabei steht der Aspekt der primären Prävention degenerativer Erkrankungen, wie z. B. Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen im Vordergrund. Auch in der Sekundärprävention gewinnen sogenannte Phytopharmaka an Bedeutung. Zunehmendes Interesse erlangten in den letzten Jahren die Phytoestrogene, deren molekulare Mechanismen im Stadium der Brustkrebs-Initiation in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

1.1 ERNÄHRUNG UND KREBS

In den westlichen Industrienationen stellen Krebserkrankungen nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache dar. In Deutschland sterben jährlich mehr als 211.000 Menschen (25 %) an den Folgen maligner Tumore [1]. Darunter ist Brustkrebs die bei Frauen am häufigsten auftretende Krebserkrankung mit einer Inzidenzrate von 26 % und einer Mortalitätsrate von 20 %. Erkrankungen der männlichen Brustdrüse treten eher selten auf (Inzidenz 0,2 %) [2]. Im weltweiten Vergleich zählt Brustkrebs zur zweithäufigsten Krebsart bei Frauen mit 1,05 Millionen neuen Fällen pro Jahr (10 %), davon über 50 % in entwickelten Ländern, und zur fünfthäufigsten Todesursache mit 373.000 Fällen pro Jahr (6 %) [3]. Zu den Gebieten mit höchstem Erkrankungsrisiko gehören Nordamerika, Nord- und Westeuropa sowie Australien und Neuseeland.

Nur etwa 5 % aller Krebserkrankungen beruhen auf genetischen Dispositionen, die Mehrheit, etwa 75 %, werden durch exogene Faktoren wie Ernährung und Lebensstil (Tabakkonsum, Sexualverhalten, Alkoholmissbrauch) sporadisch ausgelöst [4]. Daraus kann man schlussfolgern, dass viele Krebserkrankungen vermeidbar sein sollten. Im Hinblick auf die hohe Mortalität, für das Mammakarzinom liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 50 % [5], gewinnt die frühzeitige Prävention der Karzinogenese zunehmend an Bedeutung. In diesem Zusammenhang wird der Ernährung eine zentrale Rolle zugeschrieben.

1.2 MAMMAKARZINOGENESE

1.2.1 AUFBAU UND ENTWICKLUNG DER BRUSTDRÜSE

Die weibliche Brust (*lat. mamma*) (**Abbildung 1.1**), gebildet aus dem milchproduzierenden Drüsenepithel, Binde- und Fettgewebe (*Stroma*) sowie versorgenden Nerven und Gefäßen, liegt dem großen Brustmuskel (*Musculus pectoralis major*) auf. Die Mammarydrüse besteht aus 15-20 verzweigten tubulo-alveolären Drüsenlappen, die ins lockere Bindegewebe eingebettet

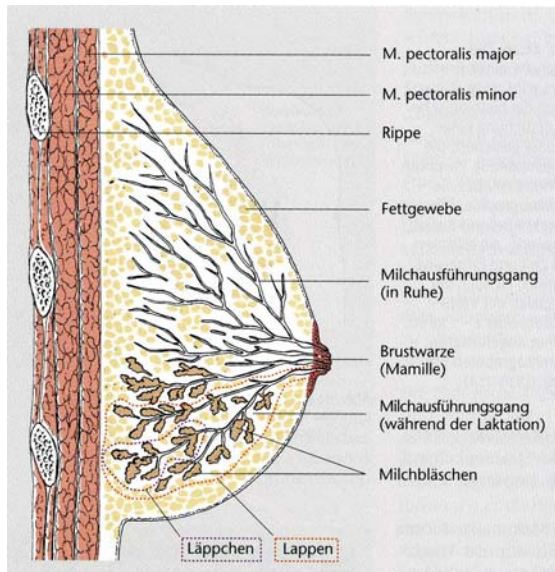


Abbildung 1.1: Feinbau der weiblichen Brustdrüse

Die obere Bildhälfte zeigt das Brustgewebe in der Ruhephase, die untere den Feinbau während der Stillperiode.

Die Entwicklung der Brust beginnt in der Pubertät und steht unter der Kontrolle hypophysärer und ovarialer Hormone, der Ernährung und von Wachstumsfaktoren [8]. Die lobuläre Entwicklung steht nicht in Beziehung zum Alter sondern eher zur Reproduktionsgeschichte. Bei postpubertären kinderlosen Frauen überwiegen die am geringsten differenzierten Strukturen der Lobules Typ 1 (5-6 Alveolen), die sich zu Lobules Typ 2 (47 Alveolen) weiterentwickeln. Während der Schwangerschaft verzweigt sich das Brustparenchym weiter und bildet höher differenzierte sekretorische lobuläre Strukturen (Lobules Typ 3; 81 Alveolen). Im letzten Schwangerschaftstrimester dehnen sich die Alveolen aus, um die Funktion der Milchsekretion erfüllen zu können (Lobules Typ 4) und sind während der gesamten Laktationsperiode präsent. Danach entwickeln sich diese zu Lobules Typ 3 und 2 zurück. Mit dem Eintritt in die Menopause kommt es zur Rückentwicklung zum proliferationsaktiven Lobules Typ 1 [9].

1.2.2 TUMORIGENESE

Krebs ist eine mehrstufige, multifaktoriell bedingte Erkrankung, die sich meist über einen Zeitraum von vielen Jahren entwickelt und in deren Verlauf es zur Akkumulation von Mutationen an zellwachstumsregulatorischen Genen (Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen, Reparaturgenen) kommt. Der Prozess der Karzinogenese wird in die Stadien Initiation, Promotion und Progression unterteilt. Auslöser sind sowohl exogene Faktoren (z. B. Pro-/Kanzergene, Röntgenstrahlung, onkogene Viren) als auch endogene Faktoren (z. B. Hormone, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Mutationen in der DNA Mismatch-Reparatur).

sind. Jeder Drüsenlappen setzt sich aus kleineren Lappen (*Lobules*) und diese wieder aus Milchbläschen (*Alveolen*) zusammen, die von einem Zylinderepithel ausgekleidet werden. Die Alveolen stehen über terminale Milchgänge (*terminal end buds*) mit den intralobulären Ausführungsgängen (*Ductules*) in Verbindung, die in den Hauptmilchgang (*Ductus*) einmünden, welcher auf der Brustwarze (*Mamille*) endet [6;7].

Die Identifizierung früher maligner Veränderungen in der Brust ist schwierig, da die Evolution der Brusttumore noch nicht geklärt ist. Bekannt ist, dass die Tumorentwicklung aus proliferativen Erkrankungen, den Hyperplasien, hervorgeht, aber noch unbekannt ist, ob diese präneoplastischen Vorstufen für die Tumorigenese zwingend erforderlich sind. Außerdem ist unklar, ob ein Ereignis der Progression zu einem malignen Tumor die Voraussetzung für ein weiteres Ereignis darstellt, wie im Fall der Kolonkarzinogenese [10]. Ein Modell des Mehrstufenprozesses der Brustkrebsentstehung zeigt **Abbildung 1.2**. Demnach rufen Keimbahn-Mutationen in Tumorsuppressorgenen, wie *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, Veränderungen im Zellzyklus hervor. Die daraus resultierenden und weitergegebenen Mutationen führen zur Zellentartung. Ovarialhormone (17 β -Estradiol (E2), Progesteron), genetische Variationen in Genen der Steroidhormonbiosynthese (Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) 17, CYP19) sowie Wachstumsfaktoren nehmen zusätzlich Einfluß auf die Zellteilungsrate und erhöhen das Risiko prädisponierter Zellen, einen malignen Phänotyp auszubilden. Relevante somatische Mutationen, die durch die erhöhte Proliferation entstehen, sind noch nicht gefestigt, aber schließen Mutationen im *TP53* und *HER2* Gen ein.

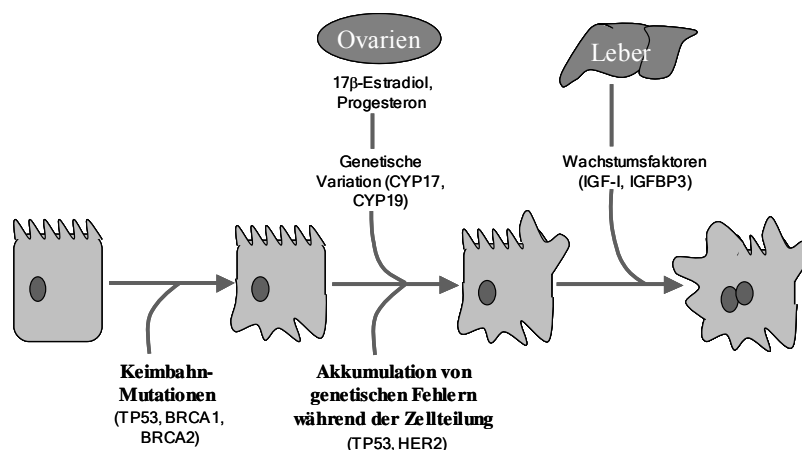


Abbildung 1.2: Modell der Brustkrebsentstehung nach Feigelson *et al.* [11]

Zu den proliferativen Vorstufen gehören duktale Hyperplasien sowie atypische Hyperplasien im Lobules bzw. Ductus, die das relative Risiko an Brustkrebs zu erkranken erhöhen. Aus den letztgenannten entwickeln sich die präkanzerogenen Vorstufen duktale Karzinome (DCIS) bzw. lobuläre Karzinome *in situ* (LCIS), welche mit einer Häufigkeit von 75 – 86 % bzw. 12 % auftreten. Die Ursprungsorte für die DCIS sind die Lobules Typ 1, für die LCIS die Lobules Typ 2. Wenn diese einen invasiven Phänotyp anzeigen, spricht man vom invasiven duktalem Karzinom (IDC) bzw. invasiven lobulären Karzinom (ILC). Die malignen Zellen können die Basalmembran durchwandern und werden über das Blut und die Lymphe in angrenzende Gewebe verteilt, wo sie Metastasen bilden [6;9].

1.2.3 ÄTIOLOGIE DES MAMMAKARZINOMS

1.2.3.1 RISIKOFAKTOREN

Über die Ätiologie des Brustkrebses ist noch sehr wenig bekannt. Die bekannten Risikofaktoren erklären nur einen geringen Anteil der Fälle. Nur etwa 5 – 10 % aller Brusttumore sind erblich bedingt, während die Mehrzahl der Tumore (90 - 95 %) sporadisch unter dem Einfluss exogener Faktoren entsteht [6;10].

Zu den **erblichen Formen** des Brustkrebses zählen der „site-specific“ Brustkrebs und das Mamma- und Ovarialkarzinom-Syndrom mit Mutationen in den sogenannten „high-penetrance“ Brustkrebsempfindlichkeitsgenen (hohes Brustkrebsrisiko für die Träger dieser Allele) *BRCA1* und *BRCA2*. Diese Defekte sind für ca. 75 % der familiären Mammakarzinome verantwortlich. Weiterhin gehören Ataxia Telangiectasia (*ATM*), das Li-Fraumeni-Syndrom (*p53*), die Cowden's Disease (*PTEN*) und das Muir Torre Syndrom (Mismatch-Reparatur und Mikrosatelliten-Instabilität) zu den erblich bedingten Brustkrebs-erkrankungen [6]. Die Tumorsuppressorgene *BRCA1*, *BRCA2*, *p53*, *PTEN* und *ATM* sind in Prozesse der Erhaltung der genomischen Stabilität, der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden, der transkriptionellen Regulation und Zellproliferation involviert [10].

Genetische Polymorphismen in „low-penetrance“ Brustkrebsempfindlichkeitsgenen (geringes bis moderates Krebsrisiko für Allel-Träger) bestimmter Phase I- (*CYP1A1* und *1A2*; N-Acetyltransferasen *NAT1*, *NAT2*) bzw. Phase II-Enzyme (Glutathion *S*-Transferasen (*GST*) *M1*, *P1*, *T1*), welche maßgeblich an der Biotransformation der Steroide und vieler Xenobiotika beteiligt sind, werden ebenfalls im Zusammenhang mit einem erhöhten Krebsrisiko diskutiert, ebenso wie DNA-Reparaturgene (*XRCC1*, *XRCC3*, *ERCC4*) [6].

Benigne Brusterkrankungen wie atypische Hyperplasien erhöhen das Risiko für Brustkrebs um das 4-5-fache. Das **Lebensalter** zeigt einen linearen Zusammenhang zur Inzidenz, die sich alle 10 Jahre verdoppelt [12].

Zu den gesicherten Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs gehören die **endogenen Estrogene**. Das vorherrschende, im Plasma zirkulierende Estrogen ist E2. Nur 1-2 % zirkulieren frei, der Hauptteil (98 %) ist an Proteine wie Steroidhormon-bindendes Globulin (SHBG) und Albumin gebunden [13]. Die lebenslange Estrogen-Exposition wird durch verschiedene Variablen bestimmt: Zeitpunkt des Eintrittes in die Menarche, Alter bei der ersten Schwangerschaft, Zahl der Schwangerschaften sowie Alter beim Eintritt in die Menopause. Eine frühe Menarche (< 12 Jahre) erhöht das Brustkrebsrisiko um 23 % und eine späte Menopause (> 55 Jahre) um 20-50 % [14]. Dies geht einher mit der erhöhten Anzahl an ovulatorischen menstrualen Zyklen und somit einer erhöhten Exposition des Brustepithels mit

Estrogenen. Liegt das Alter bei der ersten Schwangerschaft über 35 Jahre oder besteht Kinderlosigkeit, dann ist das Risiko für Brustkrebs mehr als verdoppelt [15]. Ursache dafür ist der hohe Proliferations- und geringe Differenzierungszustand der Brustepithelzellen.

Es gibt zwei Paradigmen, die die Mechanismen der Estrogene im Prozess der Brustkrebsinitiation beschreiben (**Abbildung 1.3**). Die vorherrschende Theorie ist mit deren wachstumsstimulierenden Effekten assoziiert. Eine erhöhte Zellproliferation hat vermehrte Zellteilungen und somit die Möglichkeit einer erhöhten Mutationsrate zur Folge [16]. Die neuere Theorie beschreibt die indirekte und direkte Genotoxizität der Estrogen-Metabolite, den Catecholestrogenen [17].

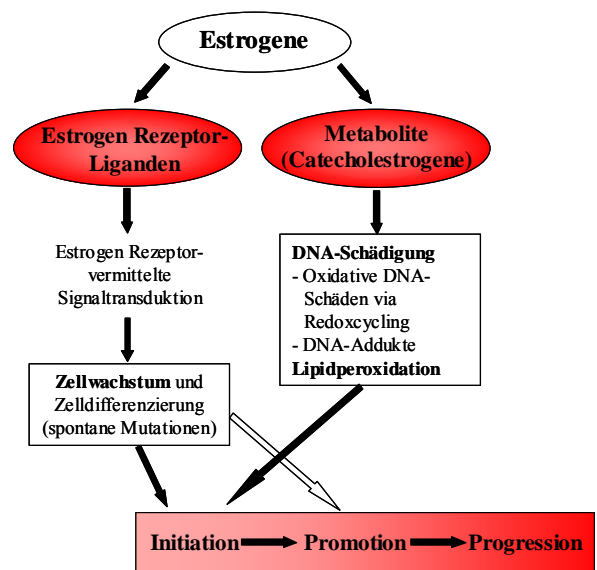


Abbildung 1.3: Estrogene als Karzinogene
(modifiziert nach [17])

Catecholestrogene entstehen durch Hydroxylierung von E2 bzw. Estron in der C2- bzw. C4-Position, katalysiert durch CYP1A1, 1A2, 1B1, und werden über die intermediären reaktiven Semiquinone zu den genotoxischen Quinonen metabolisiert (**Abbildung 1.4**). Die während des Redoxcyclings zwischen Semiquinonen und Quinonen entstehenden ROS rufen indirekt DNA-Schäden hervor, während Estrogen-Quinone direkt DNA-Addukte bilden [17].

Exogen zugeführte **Estrogene** durch *orale Kontrazeptiva* und *postmenopausale Hormonsubstitution* (Hormone Replacement Therapy) werden in Bezug auf das Brustkrebsrisiko kontrovers diskutiert. Durch die Einnahme erhöht sich das Erkrankungsrisiko, sinkt jedoch wieder nach Absetzen der Hormone [18;19].

Wachstumsfaktoren können die Initiation der Mammakarzinogenese ebenfalls fördern. Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), ein Peptidhormon, wirkt mitogen und hemmt die Apoptose [20]. Eine hohe IGF-I-Konzentration ist somit ein vorhersagender Biomarker für die Brustkrebsentwicklung, v. a. in premenopausalen Frauen [21].

Zu **Umwelt**-assoziierten Risikofaktoren für das Mammakarzinom zählen *ionisierende Strahlung* [22] und *Xenoestrogene* (endocrine disrupters) wie Organochloridverbindungen [23]. Diese stabilen und lipophilen Verbindungen können sich in der Nahrungskette anreichern und zeigen nach Aufnahme eine hohe Persistenz im Körper, u. a. im Fettgewebe der Brustdrüse. Sie können in aktivierte Estrogenmetabolite (16 α -Hydroxyestron) umgewandelt werden und somit DNA-Schäden verursachen [10].

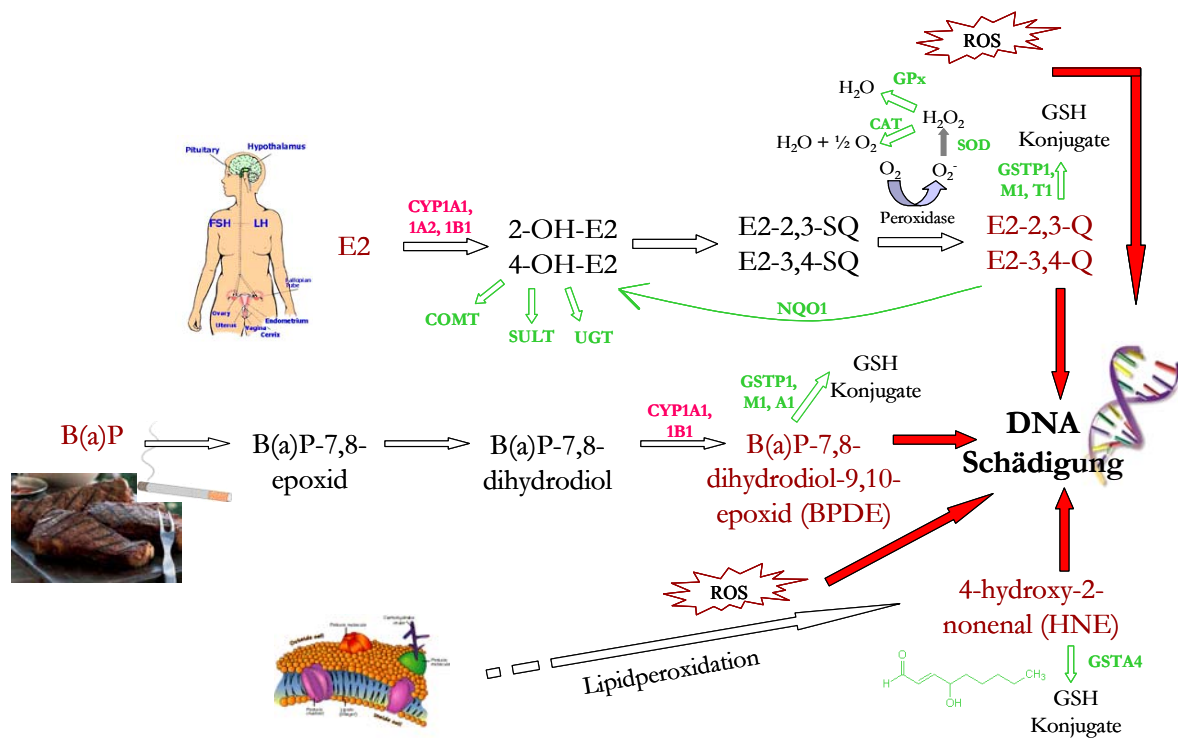


Abbildung 1.4: Darstellung ausgewählter Brustkrebs-Risikofaktoren (Estrogene, PAK, Lipidperoxidationsprodukte) mit ihren Aktivierungs- und Entgiftungswegen

(E2: 17β-Estradiol; 2-, 4-OH-E2: 2-, 4-Hydroxy-Estradiol; E2-2,3(3,4)-SQ: Estradiol-Semiquinon; E2-2,3(3,4)-Q: Estradiol-Quinon; B(a)P: Benzo(a)pyren; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; GST: Glutathion S-Transferase; GSH: Glutathion; CYP: Cytochrom P450 Monooxygenase)

Zu den sogenannten Brustkrebsrisiko-beeinflussenden **Lifestylefaktoren** gehören die Ernährung, der Body Mass Index (BMI), die sportliche Aktivität, der Alkoholkonsum sowie das Tabakrauchen. Risikoerhöhend ist eine **Ernährung**, welche reich an Fleisch, tierischen Fetten, raffinierten Kohlenhydraten (Zucker und Stärke) und arm an Obst und Gemüse sowie Ballaststoffen ist („Western style diet“) [24]. Eine Meta-Analyse zum Fleischkonsum zeigte jedoch keine signifikante Assoziation zwischen dem Gesamtfleischkonsum, rotem und weißem Fleisch und dem Brustkrebsrisiko [25]. Demgegenüber bestimmt aber die Zubereitungsart wie starkes Grillen und Braten das Risiko. Dafür verantwortlich gemacht werden Inhaltsstoffe wie polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) (**Abbildung 1.4**) und heterozyklische aromatische Amine (HAA), die nach Aktivierung zu DNA-Addukten und somit zur Induktion von Mutationen führen können [26]. Im Hinblick auf eine hohe Gesamtfettaufnahme und Brustkrebs zeigen frühe epidemiologische Studien einen positiven Zusammenhang [27], jedoch neuere Daten bestätigen dies nicht [28]. Eine Risikoerhöhung wurde nur beobachtet, wenn man zudem die Gesamtkalorienaufnahme, den Protein-, Zucker- und Alkoholkonsum betrachtete [29]. Die mögliche Risikobeeinflussung durch Fette geschieht über den Estrogenmetabolismus. So wird die 16α-Hydroxylierung der Estrogene (hohe estrogenische Aktivität) gefördert und die 2-Hydroxylierung (geringe estrogenische Aktivität)

gehemmt [29]. Desweiteren spielen Lipidperoxidationsprodukte aus der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren bei der Krebsentstehung eine wichtige Rolle (**Abbildung 1.4**) [30].

Weitere Risikofaktoren, die eng mit einer hochkalorischen Ernährungsweise verbunden sind, sind ein **hoher BMI** und **Bewegungsmangel**. Bei der Bewertung des BMI gehen zum einen die Körpergröße und zum anderen das Körpergewicht ein. Ein schnelles Größenwachstum in jungen Jahren stimuliert das Wachstum der Mammaepithelzellen und macht sie so anfälliger für präkanzerogene Läsionen [23]. Die Beziehung zwischen dem BMI und dem Brustkrebsrisiko ist abhängig vom menopausalen Status. Bei prämenopausalen übergewichtigen Frauen ($\text{BMI} > 31 \text{ kg/m}^2$) besteht keine Risikoerhöhung, während diese bei postmenopausalen Frauen ($\text{BMI} > 28 \text{ kg/m}^2$) 30 % betragen kann [31]. Diese Effekte beruhen möglicherweise auf der Modifikation endogener Estrogenspiegel. Die Umwandlung von Androstenedion zu Estron durch die Aromatase (CYP19) im peripheren Fettgewebe findet bei Frauen jeden Alters statt. Allerdings geschieht die E2-Produktion in der Prämenopause hauptsächlich in den Ovarien, die dann möglicherweise durch einen negativen Feedback-Mechanismus gehemmt wird. In der Postmenopause findet die Estrogensynthese ausschließlich im peripheren Fettgewebe statt, die nicht durch solch einen Feedback-Mechanismus kontrolliert wird. Somit sind die Serum-E2-Konzentrationen erhöht. Außerdem sinken mit zunehmenden BMI die Spiegel des SHBG im Blut, so dass die Konzentration des frei verfügbaren E2 ansteigt [32].

Eine lineare Korrelation besteht zwischen dem Brustkrebsrisiko und dem **Alkoholkonsum** ($> 10 \text{ g / Tag}$) [33]. Jede weitere Erhöhung um 10 g erhöht das Risiko um zusätzliche 7 % [34]. Dabei stellt Ethanol selbst kein Karzinogen dar, aber sein Metabolit Acetaldehyd. Weitere Wirkungsmechanismen sind die Induktion von oxidativem Stress, die Erhöhung der Zellmembranpermeabilität und somit erleichterter Transfer von Karzinogenen in die Zelle sowie die Erhöhung der Serum-Estrogenspiegel, v. a. des 16α -Hydroxyestron. Auch genetische Polymorphismen wie Deletionen der Gene *hGSTMI*, *hGSTT1* und *ADH II* (Alkohol-Dehydrogenase II) bestimmen das individuelle Risiko [35].

Studien, die das **Rauchen** und dessen Einfluss auf das Brustkrebsrisiko untersuchten, lieferten kontroverse Resultate. Statistisch signifikante Effekte ergaben sich aus dem frühzeitigen Beginn und starkem Konsum [36]. Zigaretten enthalten eine Vielzahl an mutagenen Karzinogenen, darunter PAK (**Abbildung 1.4**), HAA und *N*-Nitrosoamine. Ein weiterer kanzerogener Mechanismus ist die Erzeugung von ROS [37]. Zwei Studien, die das Passivrauchen untersuchten, zeigten sich widersprechende Ergebnisse [38;39].

1.2.3.2 PROTEKTIVE FAKTOREN

Die meisten Brustkrebsrisikofaktoren stehen mit gynäkologischen bzw. endokrinologischen Ereignissen in Verbindung. Bezüglich der Protektion von Brustkrebs spielen **reproduktive Faktoren** ebenfalls eine Rolle, da sie zu einer Verminderung der Estrogen-Exposition des Brustepithels führen. Eine späte Menarche und eine frühe Menopause senken das Risiko um 30-50 % [40]. Eine Schwangerschaft in jungen Jahren (≤ 20 Jahre) sowie mehrere Schwangerschaften vermindern ebenfalls die Brustkrebsinzidenz [15]. Als zugrundeliegende protektive Mechanismen werden die frühe Differenzierung des Brustepithels und die damit niedrigere Proliferationsrate und verbesserte DNA-Reparatur diskutiert [9]. Auch eine verlängerte Laktationsperiode ist mit vermindertem Risiko assoziiert [41]. Zudem können operative Eingriffe wie prophylaktische Mastektomien das Erkrankungsrisiko hemmen. Diese Methoden werden v. a. bei prädisponierten Frauen diskutiert [40].

Dass Modifikationen der **Lifestylefaktoren** das Brustkrebsrisiko vermindern, ist bisher nicht statistisch gesichert, aber sie sind allgemein mit einer verbesserten Gesundheit verbunden. Einige können die Hormonspiegel und somit das Krebsrisiko beeinflussen.

Auch wenn Studien zur Gesamtkalorien- und Fettaufnahme keine eindeutigen Zusammenhänge zum Brustkrebs zeigen konnten, lauten die Empfehlungen, das **Normalgewicht** zu halten und die Aufnahme fettreicher Lebensmittel, v. a. solche tierischen Ursprungs zu limitieren [42]. Der Verzehr von **mehrfach ungesättigten** pflanzlichen **Ölen** sowie **Fischölen** (**ω 3-Fettsäuren**) stellt eine Risikoverminderung dar [43], der Verzehr von **Gemüse und Obst** möglicherweise auch [44]. Eine Meta-Analyse, durchgeführt von Gandini *et al.*, beschreibt eine negative Korrelation zwischen dem Gemüsekonsum und Brustkrebs, die in geringerem Maße auch zum Obstkonsum besteht [45]. Allerdings konnte die EPIC-Studie diese Zusammenhänge nicht belegen [46]. Für Brassica-Gemüse (Brokkoli) ist die Datenlage gesichert. Die enthaltenen **Isothiocyanate** beeinflussen die endogenen Hormonspiegel zugunsten der nicht-genotoxischen 2-OH-E2 [47]. Für die potenziell antikanzerogene Wirkung von Gemüse und Obst werden ausserdem verschiedene Mikronährstoffe wie antioxidative Vitamine, Mineralstoffe, sekundäre Pflanzenstoffe sowie Ballaststoffe verantwortlich gemacht. **Vitamin C** [27;45;48], **Folsäure** [49] und **Lycopin** [48] zeigten protektive Effekte auf die Mammarkarzinogenese, während die Datenlage für **Carotinoide**, **Vitamin E**, **Retinol** und **Selen** kontrovers ist [45;50;51]. Risikovermindernde Effekte wurden auch für **Ballaststoffe** beschrieben [52]. Sie nehmen Einfluss auf den enterohepatischen Kreislauf der Steroidhormone. Durch ein erhöhtes Stuhlvolumen und eine schnellere

Transitzeit erhöht sich die fäkale Ausscheidung der Steroide [53]. Ausserdem nimmt die Diät Einfluss auf den 2-/4-Hydroxyestron-Quotienten (2-OH-E1/4-OH-E1), der bei Brustkrebs erhöht ist. Eine Protein-reiche Kost erhöht und eine Kohlenhydrat- und Ballaststoff-reiche Kost erniedrigt den Quotienten [29]. Den z. Z. bedeutendsten ernährungsabhängigen protektiven Einflussfaktor auf die Mammakarzinogenese stellen die **Phytoestrogene** (Isoflavonoide, Lignane) dar. Die geografischen Unterschiede in der Krebsinzidenz, die einhergehen mit geografischen Variationen in der Ernährungsweise, bekräftigen dies. Allerdings sind die epidemiologischen Daten bezüglich Phytoestrogen-Verzehr und Brustkrebs wenig übereinstimmend [54-56]. Sicher scheint jedoch der protektive Effekt eines frühzeitigen Soja-Konsums in der Adoleszenz zu sein [57;58]. Hinsichtlich der Aufklärung der Wirkmechanismen dieser Substanzen besteht noch großer Forschungsbedarf.

Zu den sogenannten Lifestyle-Faktoren zählt auch die **sportliche Aktivität**, die mit einer Risikoverminderung assoziiert ist, wenn diese v. a. beginnend in der Kindheit und Pubertät ausgeführt wurde. Dies führt zu einer Stärkung der Immunfunktionen, zu einer Reduktion des Körperfettes und zu einem späteren Eintritt in die Menarche und somit zu geringeren zirkulierenden Estrogenspiegeln [59].

Aufgrund der Fähigkeiten von **Alkohol**, die Serum-Estrogenspiegel zu erhöhen, den hepatischen Metabolismus zum karzinogenen Acetaldehyd zu stimulieren, die Aufnahme von Karzinogenen in Zellen zu verbessern und die Aufnahme und Bioverfügbarkeit von protektiven Nährstoffen zu vermindern, wird empfohlen, den übermäßigen Alkoholkonsum (> 10 g / Tag) zu vermeiden [40].

1.2.4 EPIDEMIOLOGIE DES MAMMAKARZINOMS

Die Brustkrebs-Inzidenzraten stiegen in den letzten 20 Jahren stetig an. Risikogebiete sind Nordamerika, Australien und Neuseeland sowie Nord- und Westeuropa. Im Vergleich zu China, Japan und anderen asiatischen Ländern liegt die Mortalität 3-6-fach höher (**Abbildung 1.5**). Aber es existieren auch regionale Unterschiede in Europa. Länder wie Finnland, Schweden, Spanien und Italien weisen niedrigere Krebsinzidenzraten auf [3]. Auf der Suche nach den Hintergründen gaben Migrationsstudien Aufschluss darüber, dass die Lebensweise und die Ernährung die Hauptursachen dieser Unterschiede sind [60]. Zahlreiche epidemiologische Studien weisen auf eine inverse Beziehung zwischen dem Brustkrebsrisiko und einer Ernährung reich an Soja- und Vollkornprodukten, speziell Roggen und Leinsamen hin. Die wertgebenden Inhaltsstoffe, denen die protektiven Wirkungen zugeschrieben werden, sind die bereits erwähnten Phytoestrogene, zu denen die Isoflavone und Lignane gehören. Es

wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese die Brustkrebs-Inzidenz durch Veränderung der Steroidhormon-Produktion, deren Metabolismus sowie deren Wirkungen beeinflussen [61].

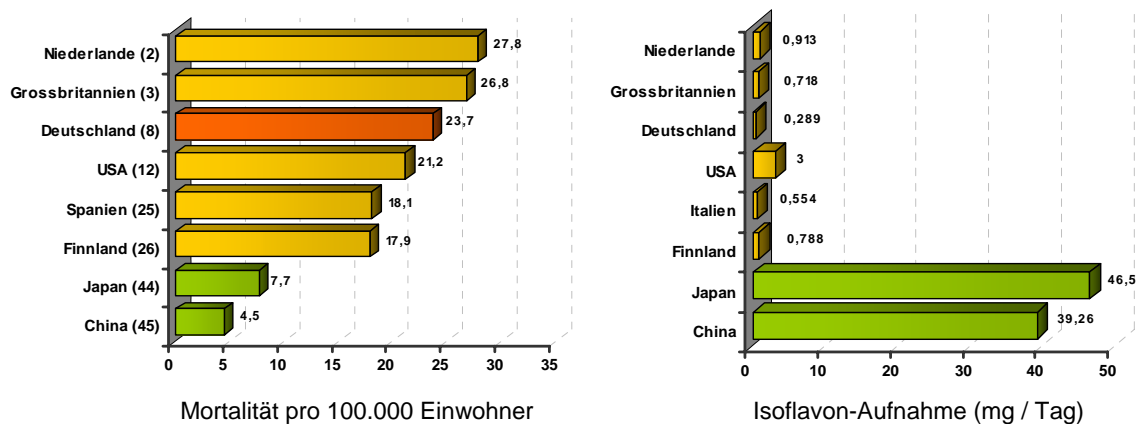


Abbildung 1.5: Internationaler Vergleich der Brustkrebs-Mortalitätsraten (pro 100.000 Einwohner) (links) und der Isoflavon-Aufnahme (mg pro Tag) (rechts)

(verändert nach [3;55;62-67])

Die niedrige Prävalenz von Brustkrebs in Asien ist eng mit einer Ernährung, die reich an Sojaprodukten ist, assoziiert. Die geschätzte tägliche Soja-Aufnahme beträgt ca. 10-50 g in Asien im Vergleich zu nur 1-3 g in den USA und Europa [68]. Diese Zahlen entsprechen einer geschätzten täglichen Isoflavon-Aufnahme von 15-100 mg in Asien [62;63;69] versus 0,5-3 mg in den USA und weniger als 1 mg in Europa (**Abbildung 1.5**) [55;64-66]. Daraus resultieren Isoflavon-Plasmakonzentrationen von ca. 760-950 nM in Asiaten [70-73] und ca. 10-50 nM in Europäern [72;74]. Vegetarier weisen im Vergleich zu Omnivoren ca. 4-fach höhere Plasmakonzentrationen auf, wie eine finnische Studie belegt [75]. Es gibt experimentelle Befunde, die zeigen, dass die Isoflavone zur Inhibierung der Brustkrebs-Entwicklung und damit zu den chemoprotektiven Eigenschaften der Sojaprodukte beitragen [76;77].

Eine Ernährung, die reich an Vollkornprodukten, Beeren und bestimmten Gemüsen ist, korreliert mit höheren Plasmaspiegeln und einer erhöhten renalen Exkretion von Lignan, was mit einer erniedrigten Brustkrebs-Prävalenz einhergeht [78;79]. Die tägliche Lignan-Aufnahme, dazu zählen die pflanzlichen Vorstufen Matairesinol und Secoisolariciresinol, liegt in Europa und den USA unter 1 mg (601 µg / d bzw. 578 µg / d) [64;67]. Daraus resultieren erreichbare Enterolacton-Plasmakonzentrationen bei Europäern von 20-70 nM [79-81]. Asiaten weisen vergleichbare Plasmaspiegel auf. Bei einer ausschließlich vegetarischen Ernährungsweise sind die Enterolacton-Gehalte im Plasma erhöht (ca. 90 nM) [75].

Die epidemiologische Datenlage, das Brustkrebsrisiko und die Phytoestrogenaufnahme und/oder renale Ausscheidung betreffend, ist jedoch nicht konsistent. So zeigten einige

Studien keinen Einfluss der Soja-/Lignan-Aufnahme [46;82] bzw. der renalen Ausscheidung [54;83] auf das Brustkrebsrisiko.

1.3 PHYTOESTROGENE

1.3.1 EINTEILUNG, VORKOMMEN UND GEHALTE IN LEBENSMITTELN

Sekundäre Pflanzenstoffe (Phytochemicals), denen gesundheitsfördernde Wirkungen nachgesagt werden, gewinnen zunehmend Bedeutung in der Primärprävention durch die Ernährung [84]. Insbesondere die Phytoestrogene sind in den letzten Jahren verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.

Phytoestrogene sind ihrer Definition durch die „British Working Group on Phytoestrogens“ nach pflanzliche Substanzen oder Metabolite, die biologische Effekte in Vertebraten induzieren und die Wirkungen von endogenen Estrogenen gewöhnlich durch Bindung an die Estrogenrezeptoren (ER) nachahmen bzw. modulieren können [85]. Aus chemischer Sicht gehören sie zu den Polyphenolen und sind in 4 Strukturklassen unterteilt: die Isoflavone, die Coumestane, die Prenylflavonoide sowie die Lignane (**Abbildung 1.6**). Die diphenolischen, nicht-steroidalen Pflanzenverbindungen weisen Strukturähnlichkeiten zu den menschlichen Estrogenen auf (**Abbildung 1.6**), wovon sich deren estrogen-mimetische Wirkung ableiten lässt [86]. Dabei ist der räumliche Abstand zwischen den beiden aromatischen Hydroxylgruppen am C-7 und C-4' der Isoflavone, der identisch ist mit dem zwischen den Hydroxylgruppen am C-3 und C-17 von E2, von Bedeutung [87].

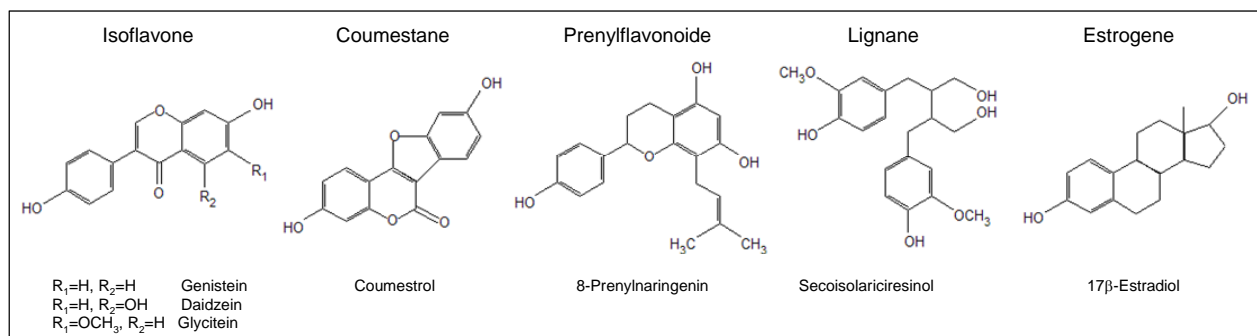


Abbildung 1.6: Strukturklassen der Phytoestrogene im Vergleich zu Estrogenen

Isoflavone kommen in der Familie der Leguminosen (Fabaceae), denen Soja-, Mungo-, weitere Bohnensorten sowie Erbsen angehören, vor, aber auch im Klee. Die mengenmäßig höchsten Gehalte der biologisch aktiven Isoflavone Genistein (GEN) und Daidzein (DAI) sind in Sojabohnen und den traditionellen asiatischen Sojaprodukten (Sojamilch, Tofu, Miso, Tempeh) zu finden. Aber auch Sojamehl, Sojaprotein-Konzentrate und Isoflavon-Isolate

weisen hohe Isoflavonkonzentrationen auf. Diese Produkte werden in westlichen Ländern in der Lebensmittelindustrie zur Erzeugung der sogenannten „second generation soy foods“ (Fleischanaloge, Joghurt, Käse, Milch) eingesetzt (**Tabelle 1.1**) [88] und gewinnen somit in der Ernährung zunehmend an Bedeutung.

Tabelle 1.1: Phytoestrogen-Gehalt in Lebensmitteln (mg/100g) (aus [76;89;90])

Lebensmittel	GEN	DAI	SECO	MAT
Sojabohnen	13-138	13-101	0,01-0,27	Spuren
Sojamehl	2,8-144	1,7-123	0,13	0
Sojamilch	1,1-11	1,1-9,8	0	0
Tofu	8-21	6,3-11	0	0
Tempeh	29-42	18-41	0	0
Miso	12-52	7,1-37	0	0
Sojaprotein-Isolate	27-105	7,7-69	0	0
Sojaprotein-Konzentrat	40-76	17-91	0	0
Sojakäse	2,0-38	1,4-21	0	0
Sojagetränk	2,1-7,1	0,7-4,1	0	0
Mungobohnen-Sprossen	1,9	0,75	0,47	0,001
Leinsamen	0	0	370	1,1
Roggen	0	0	0,47	0,17
Brokkoli	0,007	0,005	0,41	0,02
Karotten	0,002	0,002	0,2	0,003
Obst	0-0,02		n.d.	n.d.
Erdnüsse	0,08-0,39	0,01-0,05	0,33	Spuren
Schwarztee	0	0,03	2,5	0,19
Kaffee	0	0	0,72	n.d.

In den Sojapflanzen und Sojaprodukten liegen die Isoflavone als Zuckerkonjugate (Genistin, Daidzin) vor, die zusätzlich mit Malonyl- und Acetylresten verestert sein können [85]. Demgegenüber dominieren in fermentierten Sojaprodukten (Miso, Tempeh) die Aglykone, da der Zuckerrest bei der Fermentation durch die Mikroorganismen enzymatisch abgespalten wird [91]. Weiterhin wurden hydroxylierte GEN- (8-OH-GEN) und DAI-Metabolite (6- und 8-OH-DAI) detektiert, deren Bildung auf mikrobielle CYP-Aktivitäten zurückzuführen ist [92;93]. In Lebens- und Futtermitteln (Klee, Alfalfasprossen) kommen vereinzelt Formononetin und Biochanin A, 4'-Methylderivate des DAI und GEN, vor [94].

Coumestane mit dem Hauptvertreter Coumestrol sind hauptsächlich in Klee aber auch in Soja-, Mungobohnen-Sprossen und Alfalfa zu finden [76]. Prenylflavonoide wie 8-Prenyl-naringenin und Xanthohumol sind im Hopfen enthalten [95].

Pflanzliche Lignane, chemisch gesehen di-1,4-Benzylbutane, sind weit in der Natur verbreitet und in Vollkornprodukten, Leinsamen, Beeren, Früchten, Gemüse, Nüssen, Tee und

Kaffee zu finden (**Tabelle 1.1**) [76]. Vertreter sind Secoisolariciresinol (SECO), Matairesinol (MAT), Pinoresinol, Lariciresinol, Syringaresinol und Arctigenin [96]. Sie stellen Vorstufen der beiden Säugerylignane Enterodiol (END) und Enterolacton (ENL) dar.

Die Variabilität der Phytoestrogen-Konzentrationen in Pflanzen ist abhängig von der Pflanzenspezies, der Art, der geografischen Lage und dem Klima [97]. Die für die westliche Ernährung relevanten Phytoestrogen-Klassen sind die Isoflavone und die Lignane.

1.3.2 BIOVERFÜGBARKEIT

Bioverfügbarkeit definiert den Anteil eines aufgenommenen essentiellen Nährstoffes, der für normale physiologische Funktionen genutzt wird [98]. Übertragen auf nichtessentielle Nährstoffe wie Phytoestrogene bezieht sich das auf deren Konzentration in den Zielgeweben. Die Bioverfügbarkeit der Phytoestrogene ist bestimmt durch die Aufnahme, den Umfang und die Rate der Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt, die Verteilung in Körperflüssigkeiten und peripheren Geweben, den Metabolismus und die Ausscheidung. Die Datenlage für Isoflavone ist durch zahlreiche Bioverfügbarkeitsstudien gesichert, während für die Lignane kaum Informationen dazu existieren.

1.3.2.1 AUFNAHME UND RESORPTION

Isoflavone liegen in nicht-fermentierten Sojaerzeugnissen v. a. in glykosidischer Form, in fermentierten Produkten vorrangig als Aglykone vor. Aglykone können aufgrund ihrer Lipophilie und des geringen Molekulargewichtes im Dün- und Dickdarm rasch durch passive Diffusion resorbiert werden [99]. Für Glykoside aus der Nahrung werden verschiedene Resorptionswege diskutiert. Bei Flavonoid-Glykosiden (Quercetin) gibt es Hinweise darauf, dass eine aktive Aufnahme mittels spezifischer Glukose-Transporter (SGLT1) erfolgt [100]. Allerdings widerlegen zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Studien diesen Resorptionsmechanismus für Isoflavone, da keine Glykoside in Darmzellen und im Plasma nachgewiesen werden konnten [99;101;102]. Die Aufnahme erfordert also eine Hydrolyse der Glykoside zum Aglykon. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Glykoside erst durch β -Glukosidasen bzw. β -Glucuronidasen der Mikroflora des distalen Ileums und Kolons (*Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Bacteroides*, *Fusobacteria*) gespalten werden [103;104]. Humanstudien aber zeigten, dass die Resorption der Isoflavone bereits 15 min bzw. 30 min nach der Nahrungsaufnahme erfolgte, mit maximalen Plasmakonzentrationen nach 2-12 h [105;106], was auf eine Hydrolyse im oberen Gastrointestinaltrakt hinweist. Dies belegen auch Experimente mit keimfreien Ratten, die nach Gabe von Glykosid-haltigen Sojaprotein GEN und DAI im Urin ausschieden [105]. Die hauptsächliche Spaltung der Glykoside erfolgt

durch zytosolische bzw. membranständige β -Glukosidasen, letztere lokalisiert in der Bürstensaummembran des Dünndarms wie z. B. die Lactase-Phlorizin-Hydrolase [107]. Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass eine Hydrolyse im Speichel möglich ist [108], aber nicht im Magen [109].

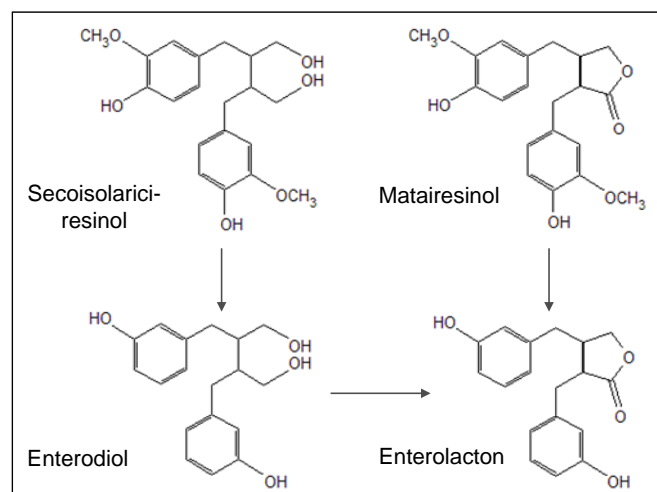
In Vollkornprodukten findet man pflanzliche Lignane wie SECO, MAT, Pinoresinol, Lariciresinol, Syringaresinol, 7-Hydroxy-MAT und Arctigenin [96]. Diese, die ebenfalls als Zuckerkonjugate aufgenommen werden, werden zunächst durch die Darmflora hydrolysiert. Nach Entfernen der Glukose-Reste erfolgt eine Dehydroxylierung und Demethylierung der Vorstufen SECO und MAT zu den diphenolischen Verbindungen END und ENL, welche anschließend resorbiert werden. Zusätzlich kann END zu ENL umgewandelt werden [86].

1.3.2.2 METABOLISMUS

Der Metabolismus der Isoflavone und Lignane, vermittelt durch intestinale Enzyme und durch die Darmmikroflora, findet vor der Resorption (**Kapitel 1.3.2.1**) und während der enterohepatischen Zirkulation im Darm aber auch nach erfolgter Resorption in der Leber statt.

Der Metabolismus (**Abbildung 1.7**) der aufgenommenen Pflanzenlignane findet hauptsächlich vor der Resorption im proximalen Kolon statt. Dieser ist sehr effizient und für die Resorption der Lignane essentiell, da nur vernachlässigbar geringe Konzentrationen der pflanzlichen Lignane (SECO, MAT) im Blut und Urin nachweisbar sind. Die Bedeutung der Mikroflora wird durch *in vitro*- und *in vivo*-Experimente deutlich, die zeigten, dass keimfrei gehaltene Ratten sowie Menschen nach einer Antibiotika-Behandlung keine Enterolignane im Urin aufwiesen [110;111]. Allerdings gibt es noch wenig Kenntnis darüber, welche intestinalen Bakterienstämme am Metabolismus der Lignane beteiligt sind. Xie *et al.* konnten zeigen, dass *Enterococcus faecalis* Pinoresinol zu Lariciresinol umwandelt, welches eine Vorstufe von ENL darstellt [112]. Die Detektion von oxidierten ENL- und END-Metaboliten im Urin weist darauf hin, dass Phase I-Reaktionen, katalysiert durch CYP, möglich sind [113]. Es wird vermutet, dass diese hydroxylierten Metabolite Intermediate der bakteriellen Umwandlung von SECO bzw. MAT in END bzw. ENL sind [113].

Abbildung 1.7: Metabolismus der Pflanzenlignane in die Säugerlignane



Werden die durch bakterielle β -Glukosidasen freigesetzten Isoflavon-Aglykone nicht resorbiert, können sie im Laufe der Darmpassage einer reduktiven Metabolisierung durch Darmbakterien unterliegen. DAI wird zunächst zu Dihydrodaidzein (DHDAI) reduziert, welches anschließend entweder durch Spaltung des C-Ringes zu *O*-Demethylangolensin (*O*-DMA) oder unter Erhalt des C-Ringes zu Equol (EQU) verstoffwechselt wird (**Abbildung 1.8**). EQU besitzt ein chirales Zentrum und kommt somit in zwei Konfigurationen vor, dem R- und S-Enantiomer. Die biologisch aktive Form *in vivo* ist S-EQU [114]. GEN wird im ersten Schritt, analog zu DAI, zu Dihydrogenistein (DHGEN) reduziert, welches weiter über 6-Hydroxy-*O*-Demethylangolensin (6-OH-*O*-DMA) zum Endprodukt *p*-Ethylphenol verstoffwechselt wird (**Abbildung 1.8**) [115-117]. Die entstandenen Metabolite können alle absorbiert werden. Für den reduktiven Metabolismus verantwortliche Bakterien sind *E. coli* Stämme wie HGH6 und HGH21, die für die Spaltung der glykosidischen Bindung und zur Bildung der Dihydro-Verbindungen fähig sind, sowie das *Clostridium* HGH136, welches den Metabolismus von DAI zu *O*-DMA katalysiert [103;104;118]. *Eubacterium ramulus* metabolisiert DAI zu *O*-DMA sowie GEN zu 6-OH-*O*-DMA [119], *Streptococcus intermedius*, *Ruminococcus products* und *Bacteroides ovatus* metabolisieren DAI zu EQU und speziell *Julong 732*, ein gram-negatives Bakterium, die Reduktion von DHDAI zu S-EQU [118].

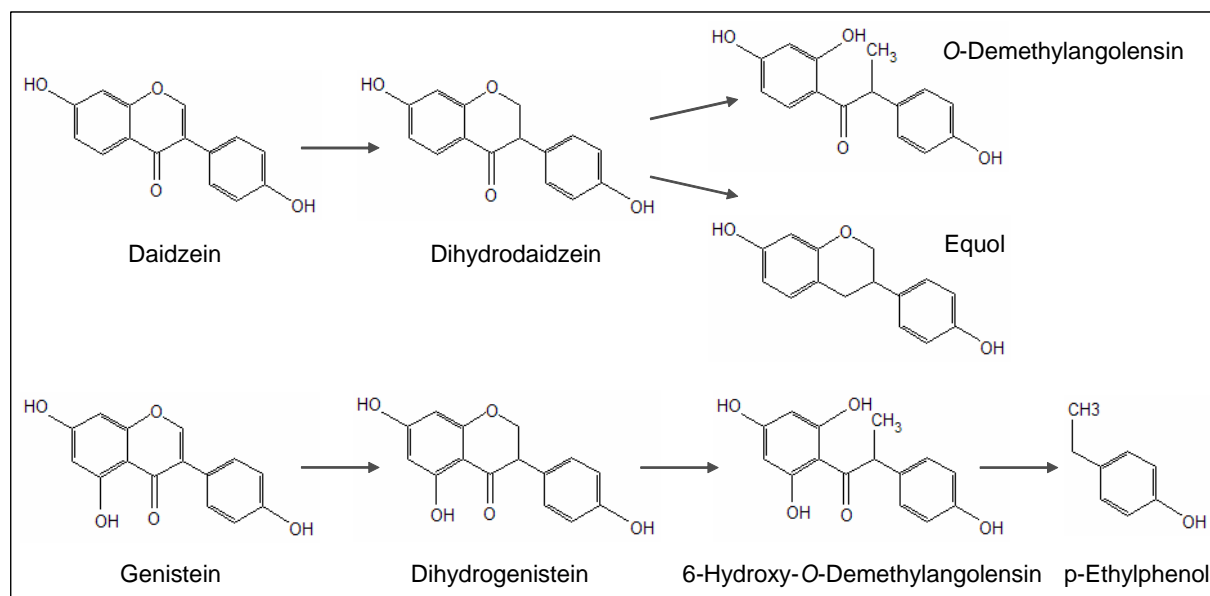


Abbildung 1.8: Reduktiver Metabolismus von Daidzein und Genistein

Nach ihrer Resorption können die Isoflavone auch in CYP-vermittelten Phase I-Reaktionen zu verschiedenen mono-, di- und trihydroxylierten Verbindungen oxidiert werden [120;121]. Als beteiligte biliäre und intestinale CYP wurden CYP1A1, 1A2, 1B1, 2E1 und 3A4 identifiziert [122].

Nach ihrer Resorption gelangen Lignane und Isoflavone über die Pfortader in die Leber, wo sie Phase II-Konjugationsreaktionen wie Glucuronidierung bzw. Sulfatierung unterliegen, welche durch UDP-Glucuronyltransferasen (UGT) bzw. Sulfotransferasen (SULT) katalysiert werden [123]. Neuere Studien zeigen, dass diese Konjugationsreaktionen zusätzlich in Enterozyten der Darmwand beim Übergang der Phytoestrogene in die Blutbahn stattfinden [124]. Neben den am häufigsten auftretenden Monoglucuroniden entstehen Diglucuronide, Mono- und Disulfate sowie Sulfoglucuronide [74;125]. Im Plasma liegen GEN und DAI nur zu 14 % bzw. 11 % als Aglykone vor, während 8 % bzw. 26 % sulfatiert, 48 % bzw. 33 % glucuronidiert und ca. 30 % sulfoglucuronidiert vorkommen [126]. Der geringe Aglykon-Anteil der Lignane im Blut weist ebenfalls auf eine hohe Konjugationsrate hin [127].

Die Konjugate treten in die systemische Zirkulation ein. Wenn sie mit der Galle in den Darm gelangen, werden sie erneut durch die Darmflora dekonjugiert, und die entstehenden Aglykone können anschließend reabsorbiert werden. Somit unterliegen die Phytoestrogene ähnlich den körpereigenen Steroidhormonen einem enterohepatischen Kreislauf, was zu einer verlängerten Exposition mit diesen Phytochemicals führt [87;128].

1.3.2.3 VERTEILUNG IN PERIPHERE GEWEBE

Nach Resorption, Transport über die Pfortader in die Leber sowie Metabolismus im Darm und in der Leber treten die Phytoestrogene in die systemische Zirkulation ein und sind somit in zahlreichen Körperflüssigkeiten wie z. B. Plasma, Urin, Fäzes, Gallenflüssigkeit, Speichel, Muttermilch, Brustdrüsensekret und Prostataflüssigkeit nachweisbar [129]. Endogene Estrogene besitzen eine hohe Bindungsaffinität zu den Serumproteinen SHBG und Albumin, Phytoestrogene dagegen weniger und liegen somit in höherem Anteil frei vor [87]. Aber auch in Geweben wurden Isoflavon-Gehalte detektiert, die die Plasmakonzentrationen um ein Vielfaches übersteigen können [130-133]. Während im Plasma die Konjugate und Metabolite überwiegen, überwiegen in den Geweben die Aglykone [130]. Im humanen Brustgewebe prämenopausaler Frauen wurden nach Isoflavon-Gabe erhöhte GEN- (ca. 4-fach), DAI- (ca. 5-fach) und EQU-Konzentrationen (ca. 10-13-fach) im Vergleich zur Kontrolle ermittelt [71;132;133].

1.3.2.4 AUSSCHIEDUNG

Die Ausscheidung der Phytoestrogene erfolgt überwiegend auf renalem Wege. Diese umfasst bei den Isoflavonen, abgesehen von inter-individuellen Unterschieden, etwa 30 % der aufgenommenen Dosis. Die fehlenden Anteile sind vermutlich auf die intestinale Umwandlung von GEN und DAI in Metabolite zurückzuführen, die im Urin nicht identifiziert

wurden [134]. Dabei ist die Wiederfindungsrate der DAI-Metabolite größer als die der GEN-Metabolite. Die Hauptfraktion aller Isoflavone bilden dabei die Monoglucuronide. Diese umfassen bei *O*-DMA 97 %, bei EQU 32-93 %, bei DAI 79-82 % und bei GEN 53-76 %. Die zweitgrößte Fraktion stellen die Sulfoglucuronide dar (EQU: 0-43 %; DAI: 6-17 %; GEN: 2-15 %). [125]. Für die Lignane wurde eine Wiederfindung von ca. 40 % (ENL+END) beschrieben, wobei ENL mit 58 % den Hauptanteil ausmachte [135]. Die größte Fraktion der Urin-Metabolite bilden die Monoglucuronide (73-94 %), gefolgt von den Monosulfaten (2-10 %), während nur 0,3-1 % als freie Lignane detektiert wurden. END wird zudem zu 14 % als Sulfoglucuronid ausgeschieden [125;136]. Die fäkale Exkretion der Phytoestrogene ist minimal und beträgt bei den Isoflavonen ca. 1-4 % der aufgenommenen Dosis [137;138].

1.3.2.5 PHARMAKOKINETIK

Zahlreiche Humanstudien geben Hinweise zur Pharmakokinetik von Phytoestrogenen nach einmaliger Gabe eines phytoestrogenhaltigen Lebensmittels oder der isolierten Phytoestrogene. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 1.2** zusammengefasst.

Isoflavone (DAI, GEN) werden sehr schnell resorbiert. Ein Anstieg der Plasmakonzentrationen wurde bereits nach 15 min beobachtet [105], während maximale Konzentrationen nach 4-9 h erreicht wurden [99;137;139;140]. Die Plasmakurven weisen meist einen biphasischen Verlauf auf, wobei die Maximalkonzentration durch den 2. Peak definiert wird [99;137;139;140]. Diese Erscheinung ist typisch für Substanzen, die einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen. Eine weitere Erklärung ist die, dass die Resorption im Magen und im Dünndarm geringer ist als im anschließenden Kolon-Abschnitt. DAI zeigt niedrigere Plasmaspiegel (0,5-3 μ M) als GEN (1-4 μ M), da es in höherem Umfang einer Umverteilung in die peripheren Gewebe unterliegt. Bei den Plasmaspiegeln ist ein dosisabhängiger Anstieg zu verzeichnen und nach Erreichen der Maximalkonzentrationen fallen sie in einer Reaktion 1. Ordnung ab. Halbwertszeiten von GEN liegen zwischen 6-11 h, die von DAI zwischen 5-9 h [99;139-141]. 48 h nach Isoflavon-Aufnahme wird das Ausgangsniveau wieder erreicht. Isoflavone und ihre Metabolite werden größtenteils renal ausgeschieden. Dabei ist die GEN-Wiederfindungsrate im Urin mit 10-20 % deutlich niedriger als die von DAI mit 20-60 % [137-139;141], da GEN in höherem Umfang durch Darmbakterien abgebaut wird. Nur ca. 5 % der aufgenommenen Isoflavone werden biliär ausgeschieden.

Tabelle 1.2: Pharmakokinetik von Phytoestrogenen

Studien- population	Phytoestrogen- Quelle	Dosis	Klinische Parameter	Biokinetische Parameter			Wiederfindung (%)		Referenz
				t_{\max} (h)	c_{\max} (μM)	$t_{1/2}$ (h)	Urin	Fäzes	
♂ prä (USA)	Sojamilchpulver	0,7 mg/kg KG	Plasma: 0-24 h		DAI: $0,8 \pm 0,01$ GEN: $0,7 \pm 0,1$		DAI: $20 \pm 1,8$ GEN: $5,3 \pm 1,1$	Total: $0,8 \pm 0,3$	[138]
n=12		1,3 mg/kg KG			DAI: $1,2 \pm 0,2$ GEN: $1,1 \pm 0,2$		DAI: $24 \pm 2,8$ GEN: $11 \pm 1,9$	Total: $1,0 \pm 0,4$	
		2,0 mg/kg KG			DAI: $2,2 \pm 0,3$ GEN: $2,2 \pm 0,4$		DAI: $21 \pm 2,3$ GEN: $10 \pm 1,8$	Total: $2,8 \pm 0,7$	
♂ n=6 (Australien)	Sojamehl	2,7 $\mu\text{mol/kg KG}$ DAI 3,6 $\mu\text{mol/kg KG}$ GEN	Plasma: 0-35 h Urin: 0-35 h	DAI: $7,4 \pm 0,7$ GEN: $8,0 \pm 0,7$	DAI: $3,1 \pm 0,4$ GEN: $4,1 \pm 0,9$	DAI: $4,7 \pm 1,1$ GEN: $5,7 \pm 1,3$	DAI: 62 ± 6 GEN: 22 ± 4		[139]
♂ n=7 (Japan)	Kinako (gebackenes Sojabohnenpulver)	26,1 mg DAI 30,2 mg GEN	Plasma: 0-72 h Urin: 0-72 h Fäzes: 0-72 h	DAI: 6,0 GEN: 6,0	DAI: $1,6 \pm 0,3$ GEN: $2,4 \pm 0,7$		DAI: 36 GEN: 18 O-DMA: 4 ^a EQU: 7 ^a	DAI: 4 GEN: 3 O-DMA: 2 ^a EQU: 2 ^a	[137]
♀ prä (USA)			Plasma: 0-48 h						[140]
n=6	DAI	50 mg		DAI: $6,6 \pm 1,4$	DAI: $0,8 \pm 0,1$	DAI: $9,3 \pm 1,3$			
n=6	GEN	50 mg		GEN: $9,3 \pm 1,3$	GEN: $1,3 \pm 0,3$	GEN: $6,8 \pm 0,8$			
n=4	Daidzin	50 mg		DAI: $9,0 \pm 1,0$	DAI: $1,6 \pm 0,2$	DAI: $4,6 \pm 0,5$			
n=3	Genistin	50 mg		GEN: $9,3 \pm 1,3$	GEN: $1,2 \pm 0,5$	GEN: $7,0 \pm 0,8$			
♀ (USA)	Geröstete Sojanüsse	10 g=15 mg Aglykone	Plasma: 0-48 h	DAI: $5,8 \pm 0,7$	DAI: 0,4	DAI: $8,7 \pm 0,7$			[99]
n=5 prä			Urin: 0-5 d	GEN: $4,9 \pm 0,8$	GEN: 0,6	GEN: $10,8 \pm 0,7$			
n=5 post		20 g=30 mg Aglykone		DAI: $6,4 \pm 0,9$	DAI: 0,8	DAI: $7,9 \pm 0,7$			
				GEN: $4,0 \pm 0,7$	GEN: 1,2	GEN: $10,0 \pm 0,5$			
		40 g=60 mg Aglykone		DAI: $6,0 \pm 0,5$	DAI: 1,7	DAI: $7,5 \pm 0,2$			
				GEN: $6,0 \pm 0,6$	GEN: 2,2	GEN: $9,6 \pm 0,4$			
♀ prä (UK)			Plasma: 0-72 h						[141]
n=8	[¹³ C]DAI	0,4 mg/kg KG	Urin: 0-4 d		DAI: $0,3 \pm 0,1$	DAI: $8,2 \pm 0,8$	30		
		0,8 mg/kg KG			DAI: $0,7 \pm 0,2$	DAI: $7,2 \pm 0,5$	26		
n=9	[¹³ C]GEN	0,4 mg/kg KG			GEN: $0,6 \pm 0,1$	GEN: $7,5 \pm 0,4$	9		
		0,8 mg/kg KG			GEN: $0,9 \pm 0,1$	GEN: $7,4 \pm 0,4$	8		
n=7 (Finnland)	Erdbeeren	12 mg/kg TG SECO 1 mg/kg TG MAT	Plasma: 0-8 h Urin: 0-48 h	ENL: 24	ENL: 0,02				[142]
♀ n=6 ♂ n=6 (Niederlande)	SECO-Diglykosid	1,31 $\mu\text{mol/kg KG}$	Plasma: 0-96 h Urin: 0-72 h	END: $15 \pm 5,1$ ENL: $20 \pm 6,2$	END: 0,07 ENL: 0,06	END: $4,4 \pm 1,3$ ENL: $13 \pm 5,6$	ENL+END: 40		[135]
♀ n=3 ♂ n=1 (Finnland)	Sesamsaat	373 mg/100g Lignane (= 10,8 $\mu\text{mol/g}$)	Plasma : 0-24 h	10-24 h (Pflanzenlignane)	END: 0,69 ENL: 0,56	2-6 (Pflanzenlignane)			[143]

c_{\max} : maximale Plasmakonzentration; t_{\max} : Zeitpunkt von c_{\max} ; $t_{1/2}$: Halbwertszeit der Elimination;

♂: Männer; ♀: Frauen; prä: Frauen vor der Menopause; post: Frauen nach der Menopause; KG: Körpergewicht; TG: Trockengewicht; n: Probandenzahl

^aWiederfindung (%) der aufgenommenen DAI-Menge

Im Gegensatz zu den Isoflavonen ist die Lag-Phase der Lignane, d. h. die Zeit bis zum ersten Erscheinen der Säugerlignane im Plasma, mit 8-10 h stark verzögert [135;142]. Dies deutet darauf hin, dass die aufgenommenen Pflanzenlignane zunächst im Kolon bakteriell zu den Säugerlignanen metabolisiert werden müssen. Allerdings wurde berichtet, dass nach Sesam-Supplementation innerhalb von 2 h maximale Pflanzenlignan-Plasmakonzentrationen messbar waren [143]. Nach ca. 15-24 h sind die maximalen Plasmaspiegel an ENL (0,02-0,6 μM) und END (0,07-0,7 μM) erreicht, welche großen individuellen Schwankungen unterliegen. Halbwertszeiten von ENL bzw. END liegen bei 13 h bzw. 4 h. Die relativ hohen Halbwertszeiten zeigen, dass die Enterolignane im Plasma akkumulieren und steady-state Konzentrationen erreichen, wenn sie 2-3 mal am Tag konsumiert werden [143]. Auch die Lignane werden überwiegend (40 %) renal ausgeschieden.

Die Isoflavon- und Lignan-Urinkonzentrationen nehmen proportional zur Plasmakonzentration dosisabhängig mit dem Konsum zu und sind somit gute Biomarker der Exposition [129].

1.3.2.6 INTER-INDIVIDUELLE UNTERSCHIEDE IN DER BIOVERFÜGBARKEIT DER PHYTOESTROGENE

Der humane Metabolismus und die Exkretion der Isoflavone und Lignane unterliegen einer inter-individuellen Variation und sind auf Faktoren wie z. B. die Zusammensetzung der Darmflora, die Ernährung, das Geschlecht, das Alter und die Matrix der Lebensmittel zurückzuführen.

Die Bedeutung der intestinalen Mikroflora für den Phytoestrogenmetabolismus wurde durch Tierexperimente an keimfreien Ratten bzw. epidemiologischen Studien, die den Einfluss von Antibiotika untersuchten, verdeutlicht [110]. Die individuelle renale Ausscheidung von DAI und GEN unterscheidet sich 15-fach, bei EQU beträgt die Varianz das 600-fache und bei *O*-DMA das 150-fache [144;145]. Zahlreiche Studien wiesen darauf hin, dass nur ca. 30 % der Bevölkerung der westlichen Industrienationen und ca. 50 % der Asiaten in der Lage sind, EQU zu produzieren [62;99;144]. Die Einteilung in EQU-Produzenten bzw. -Nichtproduzenten erfolgt über die Plasmakonzentration bzw. die ausgeschiedene Menge im Urin. Als EQU-Produzenten gelten Personen, die Plasmawerte über 83 nM bzw. 24 h-Urinkonzentrationen über 1000 nmol aufweisen. Nichtproduzenten zeigen Plasmakonzentrationen von weniger als 40 nM und 24 h-Urinkonzentrationen von weniger als 250 nmol [99]. Auch hinsichtlich der ENL-Bildung treten inter-individuelle Unterschiede auf [146].

Im Zusammenhang mit der Darmflora ist auch die Ernährung zu diskutieren. Eine geringe Fett- und hohe Aufnahme komplexer Kohlenhydrate korreliert durch Stimulation der Fermentation mit einer erhöhten EQU- und ENL-Produktion [147-149]. Aber Ballaststoffe können die Resorption und Reabsorption der Isoflavone durch Bindung nichtkonjugierter Verbindungen und schnellerer Darmpassage auch herabsetzen [150]. Personen mit einer verlangsamten intestinalen Motilität (Obstipation), zeigten einen vollständigen Metabolismus und somit eine höhere Absorptionrate [80].

Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden in der renalen Lignan-, jedoch nicht in der renalen Isoflavonausscheidung beobachtet [151]. Bei Frauen wurden verkürzte Elimination-Halbwertszeiten sowie geringere ENL/END-Quotienten als bei Männern detektiert [151]. Jedoch wiesen Frauen nach Intervention mit Vollkornprodukten höhere ENL-Plasmaspiegel im Vergleich zu den Männern auf [152].

Altersspezifische Unterschiede zwischen Neugeborenen und Erwachsenen beruhen auf der noch nicht ausgebildeten Darmflora bei Säuglingen [153]. Keine Unterschiede traten zwischen prä- und postmenopausalen Frauen auf [74;154], aber Frankenfeld *et al.* ermittelten eine negative Korrelation zwischen dem Alter und der EQU-Produktion [155].

Die Aufnahmeform (Aglykon, Glykosid), die Matrix und die Zusammensetzung des Sojaproduktes beeinflussen die Bioverfügbarkeit der Isoflavone nicht [156]. Allerdings werden Supplemente schneller resorbiert als Phytoestrogene aus komplexen Lebensmitteln [157].

1.3.3 PHYSIOLOGISCHE WIRKUNGEN VON PHYTOESTROGENEN

Die Isoflavon-reiche Ernährung der Asiaten und die Lignan-reiche Ernährung der Skandinavier wird im Zusammenhang mit einer geringeren Morbidität und Mortalität diskutiert [123].

Der Mechanismus der Phytoestrogen-Effekte wird meist mit deren, auf ihrer Strukturähnlichkeit zum E2 beruhenden, kompetitiven Bindung an ER α und ER β diskutiert. Deren Verteilung im Körper ist gewebsspezifisch. In Leber, Brust und Uterus überwiegt ER α , im Eierstock, der Prostata und im Gastrointestinaltrakt ER β [158]. Die relative Bindungsaffinität der Aglykone zu den ER umfasst nur 0,05-1 % der Bindungsaffinität des E2 und ist zu ER β größer als zu ER α [87;159;160]. Isoflavone und Lignane können abhängig von der Konzentration der zirkulierenden endogenen Estrogene und der Häufigkeit der ER estrogen- und antiestrogen- Effekte ausüben. Aufgrund ihrer gewebsspezifischen estrogen-agonistischen (Knochen, vaskuläre Gewebe) und estrogen-antagonistischen (Brust, Uterus) Wirkung werden sie auch als „Selective Estrogen Receptor Modulators“ (SERMs) bezeichnet [161]. Der Rezeptorkomplex besitzt nach Bindung der Liganden die Fähigkeit spezifische Co-

Aktivator- bzw. Co-Repressorproteine anzuziehen, was den Umfang der agonistischen bzw. antagonistischen Wirkungen bestimmt [162;163]. Zwar ist die estrogenische Wirksamkeit der Phytoestrogene 100-1000-fach geringer als die der Estrogene, dafür ist aber ihre Plasmakonzentration 100-1000-fach höher als die der Estrogene [164], was biologische Effekte auf molekularer, zellulärer und physiologischer Ebene vermuten lässt. In diesem Zusammenhang spielt die Prävention degenerativer Erkrankungen wie Krebs-, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Osteoporose u.s.w. eine Rolle.

Die Brustkrebs-präventive Wirkung der Phytoestrogene wird auf deren *antiestrogene* Effekte, entweder direkt durch Bindung an den ER oder indirekt über die Modulation der Estrogenkonzentration, zurückgeführt. Isoflavone und Lignane nehmen Einfluss auf den Hormonhaushalt, indem sie die Estrogenneusynthese durch Hemmung katalysierender Enzyme wie z. B. Aromatase, 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase herabsetzen [165;166] und das Estrogenmetaboliten-Spektrum im Plasma durch Verringerung der 16 α - und Erhöhung der 2-Hydroxylierungsreaktionen verbessern [167;168]. Darüber hinaus inhibieren sie die Steroidsulfatase, so dass weniger biologisch aktive Estrogene aus den gering aktiven Sulfatkonjugaten freigesetzt und in die Zirkulation entlassen werden [169], und stimulieren die SHBG-Synthese in der Leber [170;171]. Weiterhin führen Phytoestrogene zu verlängerten Menstruationszyklen, was ebenfalls die Estrogenexposition herabsetzt [123;172]. Neben den hormonabhängigen Wirkmechanismen werden auch hormonunabhängige Mechanismen diskutiert, wie die Hemmung der Zellproliferation durch Zellzyklusmodulation und Induktion der Apoptose [173-176], Hemmung der Angiogenese [177] sowie Inhibierung von Tyrosinkinasen [178;179]. Für Lignane (Leinsamen) ist weiterhin eine Reduktion der IGF-I Spiegel durch Hemmung der IGF-I-Produktion, Induktion der Synthese IGF-I bindender Proteine und Herunterregulation der IGF-I-Rezeptoren beschrieben, wodurch eine retardierte Zellproliferation resultiert [180]. In Tierversuchen konnte das chemoprotektive Potential der Phytoestrogene in allen Stadien des Karzinogeneseprozesses bestätigt werden, indem die Tumorgroße und Tumorzahl infolge der Supplementation reduziert wurde [181-183].

Den Phytoestrogenen werden auch protektive *antioxidative* Eigenschaften bei Krebs- und koronaren Herzerkrankungen zugeschrieben. ROS (Hydroxyl-, Superoxid- und Peroxyl-Radikal, Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff) entstehen sowohl im normalen als auch pathologischen Zellmetabolismus sowie durch den Einfluss von Xenobiotika und ionisierender Strahlung [184]. Um den schädigenden Eigenschaften entgegenzuwirken, besitzt der Organismus antioxidative enzymatische (Superoxid-Dismutase, Katalase, GSH-Peroxidase, GSH-Reduktase, GSTs) und nicht-enzymatische (α -Tocopherol, Ascorbinsäure, GSH,

Carotinoide und Polyphenole) Schutzmechanismen [185]. Infolge einer Imbalance zwischen ROS und antioxidativen Abwehrmechanismen im Organismus entsteht oxidativer Stress, der zu reversiblen bzw. irreversiblen Schäden von Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen und DNA führt [185]. Biologische Konsequenzen sind Mutationen, Schwester-Chromatid-Austausche, Chromosomen-Abberationen und Zytotoxizität [186]. Die antioxidative Wirkung der Isoflavone, die mit zunehmender Hydroxylgruppen-Anzahl zunimmt, wird durch den Transfer von Elektronen bzw. Wasserstoffatomen und durch die Komplexierung von Metallionen vermittelt [187;188]. Auch Lignane zeigen antioxidative Effekte als Hydroxyl-Radikalfänger und beugen so Lipidperoxidationsreaktionen vor [189].

Die Strukturähnlichkeit der Phytoestrogene mit den endogenen Estrogenen, die *hypcholestämische* Effekte haben, und die in Asien seltener auftretenden Herz-Kreislauf-Erkrankungen [190] führten zu der Schlussfolgerung, dass die Phytoestrogene vor koronaren Herzerkrankungen schützen können. Lignane und Sojaprotein, aber nicht isolierte Isoflavone, beeinflussen die Cholesterin-Homöostase über Enzyme des Cholesterin-Metabolismus und führen zur Reduktion des Gesamt-Cholesterins, des LDL-Cholesterins, der Serum-Triglyzeride und zur Erhöhung des HDL-Cholesterins [191;192].

Bezüglich der Prävention klimakterischer Beschwerden und Osteoporose, welche beide durch den abrupten Abfall der endogenen Hormone hervorgerufen werden, sind die *estrogenen* Eigenschaften der Phytoestrogene von Bedeutung. Bisherige Isoflavon-Studien zeigten keine oder nur geringfügige Verbesserungen klimakterischer Beschwerden [193;194]. Soja war v. a. dann protektiv, wenn die tägliche Aufnahme niedrig war. Das Problem der meisten Studien war, dass auch in den Placebogruppen 20-30 %-ige Abnahmen der Symptome beobachtet wurden, was das Erkennen eines möglichen Isoflavon-spezifischen Effektes erschwerte. Die Aufnahme von Leinsamen konnte die Symptomatik verbessern [195]. Zur Bewertung der Osteoporose-präventiven Wirkung der Phytoestrogene sind bisher nur Kurzzeit-Studien verfügbar. Isoflavone zeigten bei prämenopausalen Frauen keinen Einfluss auf die Knochendichte [196], bei postmenopausalen Frauen dagegen eine dosis-abhängige Zunahme [197]. Für Lignane existieren keine Anzeichen für eine Verbesserung der Knochenmineralisation [191].

Neben den protektiven Effekten wurden auch negative *genotoxische* Wirkungen der Phytoestrogene beschrieben, die abhängig von deren chemischer Struktur aber unabhängig von deren estrogenen Aktivität sind. Isoflavone, speziell GEN sowie oxidative und reduktive DAI-Metabolite, induzierten Mikrokerne und strukturelle Chromosomenabberationen in verschiedenen Zellmodellen *in vitro* ($\geq 1 \mu\text{M}$) [198-201]. Die zugrunde liegenden ER-unabhängigen Wirkmechanismen umfassen die Hemmung der Topoisomerase II und der

Proteintyrosinkinasen sowie die Induktion von apurinischen Stellen in der DNA und der Lipidperoxidation [202;203]. *In vivo*, bei Mäusen und Menschen, konnten bisher infolge der Isoflavon-Exposition keine genetischen Schäden nachgewiesen werden [204;205]. Allerdings unterscheiden sich die *in vivo* Isoflavon-Plasmakonzentrationen ($\leq 1 \mu\text{M}$) und die genotoxischen *in vitro*-Konzentrationen nur ca. um den Faktor 10 [200]. Der Fakt, dass Sojaisoflavone oder ihre Metabolite genotoxisches Potential aufweisen, sollte eine kritischere Risiko/Nutzen-Betrachtung für Supplemente oder Medikamente auf Sojabasis garantieren, aber auch für Soja-Säuglingsnahrung. Durch eine Formulakost auf Sojabasis wurden Isoflavon-Plasmakonzentrationen von bis zu $2,5 \mu\text{M}$ bei 4 Monate alten Säuglingen gemessen. Damit liegt die Isoflavon-Exposition der Säuglinge 6-11-fach höher als bei Erwachsenen [206]. Für die Lignane sind bisher keine genotoxischen Wirkungen bekannt [201;207].

1.4 CHEMOPRÄVENTION

Chemoprävention ist die Verwendung chemischer und natürlicher Stoffe mit pharmakologischer Wirkung, um der Entstehung von invasivem Krebs vorzubeugen [208]. Die ideale chemopräventive Substanz für den Menschen sollte nicht toxisch, hoch wirksam und oral aufnehmbar sein, sie sollte wenig kosten, einen bekannten Wirkmechanismus haben und nicht zuletzt in der Bevölkerung akzeptiert sein [209]. Somit sind Stoffe aus unserer Ernährung von besonderem Interesse. Die Wirkmechanismen der Substanzen mit chemopräventivem Potential sind noch weitgehend ungeklärt. In Verbindung zu den Entwicklungsstadien der Karzinogenese wurden die antikarzinogenen Substanzen durch Wattenberg nach dem Zeitpunkt, bei welchem sie auf den Prozess der Karzinogenese inhibierend wirken, folgendermaßen klassifiziert [210;211]:

- **Initiation:** Substanzen, die die Bildung von Karzinogenen aus inaktiven Prokarzinogenen verhindern (z. B. Carotinoide, Tocopherole, Ascorbinsäure, Isothiocyanate, Polyphenole) und karzinogene Verbindungen daran hindern, die Targetzellen zu erreichen und mit ihnen zu reagieren („blocking agents“) (z. B. BHA, BITC).
- **Promotion und Progression:** Substanzen, die erst nach biologisch irreversibler Schädigung der Zellen durch Kanzerogene wirksam werden, indem sie das Fortschreiten der Tumorentwicklung effektiv unterdrücken („suppressing agents“) (z. B. Retinoide, Proteaseinhibitoren, PEITC, Quercetin, Catechine).

Dabei können einzelne Substanzen auch an mehreren Stellen der Karzinogenese wirksam werden [211;212].

Die chemopräventiven Strategien der „blocking agents“ beinhalten (1.) Schutz vor oxidativem Stress durch Abfangen von ROS und (2.) Schutz vor endogenen Metaboliten bzw. Xenobiotika mit genotoxischem Potential durch Hemmung der karzinogenen Bioaktivierung und Induktion von Detoxifizierungssystemen. Der zuletzt genannte Mechanismus resultiert in einer verminderten Exposition mit Karzinogenen [84]. Man spricht in diesem Zusammenhang von der enzymatischen Biotransformation, welche in drei Phasen unterteilt wird. In Phase I (Aktivierungsreaktion) werden über Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse, welche durch CYPs, Dehydrogenasen und Epoxidhydrolasen katalysiert werden, apolare, lipophile Stoffe in polare Stoffe mit meist höherem karzinogenem Potential umgewandelt. In Phase II (Konjugationsreaktion) werden polare Substrate (Fremdstoffe oder Phase-I-Metabolite) mit endogenen Molekülen (u. a. Glutathion, Glucuronsäuren, Sulfat) konjugiert, wodurch in der Regel inaktive, hydrophile und damit leichter ausscheidbare Metabolite entstehen (Entgiftung). Die GSTs, UGTs und SULTs stellen wichtige Phase II-Enzyme dar [213]. Die Phase III ist die Ausscheidungsphase. Zu den an Transportprozessen aus der Zelle beteiligten Proteinen gehören das P-Glycoprotein (MDR1) sowie „Multidrug Resistance Associated Proteins“ (MRP), die zu den ABC (ATP-Binding Cassette)-Transportproteinen gehören [214].

Im Hinblick darauf, dass das individuelle Krebsrisiko wesentlich von der Balance zwischen giftenden Phase I- und entgiftenden Phase II-Reaktionen beeinflusst wird, stellt die Verbesserung der Entgiftungskapazität der Targetzellen durch die Induktion von Phase II-Enzymsystemen einen wichtigen Mechanismus in der Krebsprävention dar [215]. Wichtige enzymatische Schutzsysteme des Brustgewebes sind NAD(P)H: Quinonoxido-reduktase (NQO1), Catechol *O*-Methyltransferase (COMT), UGTs und GSTs [159]. Aufgrund der Komplexität unserer Ernährung, welche in der Brustkrebsprävention eine bedeutende Rolle spielt, gibt es noch großen Forschungsbedarf bezüglich des Einflusses von Nahrungsinhaltsstoffen wie den Phytoestrogenen auf den Phase II-Enzymstatus, um letztlich gezieltere Ernährungsempfehlungen für eine natürliche Chemoprotektion geben zu können.

1.5 ZELLULÄRE ENTGIFTUNGSSYSTEME

1.5.1 GLUTATHION S-TRANSFERASEN

1.5.1.1 EINTEILUNG UND NOMENKLATUR

GSTs (EC 2.5.1.18) umfassen eine Supergen-Familie von zytosolischen, mitochondrialen und mikrosomalen Enzymen, charakterisiert durch ihre biochemischen, immunologischen und strukturellen Eigenschaften. Die zytosolischen Transferasen repräsentieren die Klassen α , μ , π , θ , σ , ω und ζ . Die Klasse κ stellt die mitochondriale Transferase dar. Die mikrosomalen

GSTs umfassen eine Gruppe von membrangebundenen Proteinen des Eicosanoid- und GSH-Metabolismus (MAPEG: Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism), welche in 4 Untergruppen eingeteilt sind [216]. Isoenzyme einer Klasse zeigen mindestens 40 % übereinstimmende Aminosäuresequenzen, während zwischen Isoenzymen unterschiedlicher GST-Klassen weniger als 25 % Sequenzhomologie besteht [216]. Zytoplasmatische GSTs kommen als Homo- oder Heterodimere mit einem Molekulargewicht von etwa 23–27 kD pro Untereinheit vor. Je Untereinheit besitzen GSTs eine hydrophile G-site (N-terminal), die für die Bindung von GSH verantwortlich ist, eine hydrophobe H-site (C-terminal), welche die Bindungsstelle für das elektrophile Substrat darstellt, und eine L-site, die die Bindungsstelle für Liganden bildet [217].

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Bezeichnung der GST-Isoenzyme die Nomenklatur nach Mannervik *et al.* verwendet [218].

1.5.1.2 GEWEBSSPEZIFISCHE EXPRESSION

Obwohl GSTs praktisch in allen humanen Geweben exprimiert werden, zeigt die gewebs- und zellspezifische Isoformexpression große Variabilität, ein Faktor, der die Suszeptibilität gegenüber toxischen Stoffen stark beeinflussen kann [217;219;220]. Besonders GST-reiche Organe sind Leber, Niere und Hoden [221]. Die Informationen zur GST-Isoform-Expression im Brustgewebe sind gering. Verschiedene Studien zeigten, dass hGSTP1-1, das am meisten prävalente Isoenzym in extrahepatischen Geweben [217], auch das Haupt-Isoenzym in humanem Brustgewebe darstellt [222], während die GST-Klassen α und μ gering exprimiert sind [221;223]. Hinsichtlich der GST-Expression existieren beim Menschen große interindividuelle Unterschiede, insbesondere für die GST α , μ und θ [217]. Während der Variation der μ und θ überwiegend Deletionspolymorphismen zugrunde liegen, stehen für die hohe Variabilität der GST α und π verschiedene Ursachen zur Diskussion.

1.5.1.3 BIOTRANSFORMATIONSREAKTIONEN

Die bekannteste biologische Funktion der GSTs ist die Fähigkeit, Thiol-Gruppen des Tripeptids GSH auf eine Vielzahl von Elektrophilen zu übertragen (**Konjugationsfunktion**, $\text{GSH} + \text{R-X} \rightarrow \text{GS-R} + \text{HX}$). Die resultierenden GSH-Konjugate sind im Allgemeinen, aber nicht ausschließlich, nicht-toxisch und schnell ausscheidbar [214]. Der Abbau des GS-R-Konjugats erfolgt durch Abspaltung des Glutamins durch die Glutamyltranspeptidase und des Glycins durch eine weitere Dipeptidase, so dass nur noch ein Cysteinkonjugat vorliegt. Dieses wird durch eine NAT zur Mercaptursäure, einem in der Niere ausscheidbaren Metaboliten, acetyliert [213]. Substrate der GSTs sind verschiedene Umwelttoxine (z. B. Benzo(a)pyren-

7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid, BPDE), Pestizide (z. B. Lindan), Medikamente (z. B. Menadion, Etacrynsäure) oder endogen gebildete Lipidperoxydationsprodukte (4-Hydroxy-2-Nonenal, HNE) (**Abbildung 1.9**) [224-227].

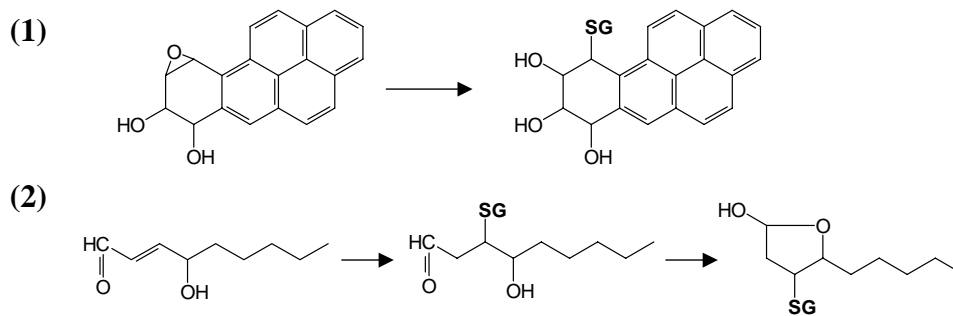


Abbildung 1.9: GST-vermittelte Entgiftung von (1) BPDE und (2) HNE (nach [216;217])

Weiterhin weisen viele GSTs eine **GSH-Peroxidaseaktivität** auf, welche die Reduktion von organischen Hydroperoxiden (aus Fettsäuren, Phospholipiden, DNA) zu ihren entsprechenden Alkoholen katalysiert ($2 \text{ GSH} + \text{R-OOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{R-OH}$). Hierbei reagiert GSH mit elektrophilem Sauerstoff [217]. Da diese Substrate infolge von Lipidperoxydation und oxidativer DNA-Schädigung entstehen, kommt der GST bei der Bekämpfung von oxidativem Stress eine wichtige Rolle zu. Einige GSTs besitzen ausserdem eine **Isomeraseaktivität**, indem sie die Umwandlung von D^5 -3-Ketosteroiden zu D^4 -3-Ketosteroiden katalysieren [217]. Darüber hinaus wirken GSTs als **intrazelluläre Transportproteine** von wasserunlöslichen Proteinen. So binden sie nichtkovalent eine Reihe von lipophilen, nicht als Substrat dienende Substanzen (z. B. Häm, Bilirubin, Gallensäuren, Steroide), deren Bindung jedoch zur Hemmung der Enzymaktivität führt. Über diesen Mechanismus sind die GSTs auch in der Lage, reaktive Metabolite von Karzinogenen kovalent zu binden und unschädlich zu machen (**nichtkatalytische Inaktivierung**) [217].

GST haben somit eine Schlüsselbedeutung in der Detoxifikation von endogenen und exogenen Karzinogenen und beugen so der Toxizität und Genotoxizität vor [216;228].

1.5.1.4 REGULATION UND INDUZIERBARKEIT DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN

Regulation und Induzierbarkeit der GSTs sind das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels aus endogenen und exogenen Parametern. Diese beinhalten geschlechts- und gewebsspezifische Faktoren, genetische Disposition sowie eine große Zahl von Xenobiotika wie PAK, phenolische Antioxidantien, ROS, welche die Induktion der GSTs beeinflussen können [217]. Die Induktion der humanen GSTs durch sekundäre Pflanzenstoffe als mechanistische Erklärung für den antikanzerogenen Effekt eines hohen Obst- und Gemüseverzehr ist mehrfach beschrieben worden. hGSTP1-1 ist durch Flavonoide und Isothio-

cyanate [229;230], durch Butyrat [219;220;231] sowie durch Antiestrogene induzierbar [222]. Der Promoter des *hGSTP1* enthält neben einer NFκB-Bindungsstelle für die Induktion durch oxidativen Stress eine AP-1-Bindungsstelle [232]. Der Promoter des *hGSTA4* Gens besitzt zwei AP-1-Bindungsstellen [233] (**Abbildung 1.10**).

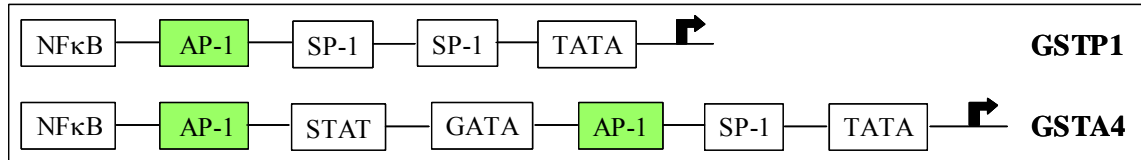


Abbildung 1.10: Struktur des *hGSTP1* und *hGSTA4* Promoters (nach [233;234])

1.5.2 NAD(P)H: QUINON OXIDOREDUKTASE

1.5.2.1 EINTEILUNG UND NOMENKLATUR

Quinon Oxidoreduktasen (DT-Diaphorase), die zu den zytosolischen Flavoproteinen gehören, nutzen im allgemeinen NADH und NAD(P)H als Elektronendonatoren [235]. Zwei humane DT-Diaphorasen sind bekannt (NQO1 und NQO2) [236;237], wobei die NQO1 (EC 1.6.99.2) die bedeutendere darstellt. Das Enzym ist ein Homodimer mit einer Größe von 30 kD. Rekombinationsstudien zeigten, dass die humanen NQO1 and NQO2 nur ca. 49 % Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz besitzen [238]. Aufgrund der Unterschiede in der Aminosäuresequenz und der verschiedenen Kosubstrate (NAD(P)H bzw. NRH) bestehen große Unterschiede in der Substratspezifität zwischen beiden Isoformen [238].

1.5.2.2 GEWEBSSPEZIFISCHE EXPRESSION

Die hNQO1-1 ist konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert, obwohl große Variationen in der Expression zwischen den Geweben beobachtet wurden. Diese Variabilität beim Menschen reicht von niedrigen Gehalten in der Brust, Lunge, Kolon und Leber bis zu hohen Gehalten im Magen und der Niere [239]. Primäre Tumorgewebeproben zeigten eine höhere hNQO1-1 Expression im Vergleich zu ihrem korrespondierenden gesunden Gewebe wie im Falle der Brust, der Ovarien, des Kolons, der Lunge und der Leber [239;240]. Tumoren des Magens und der Niere wiesen dagegen geringere hNQO1-1-Spiegel als das gesunde Gewebe auf [239], wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht geklärt sind.

Ein C→T Polymorphismus der Base 609, resultierend in einem Prolin→Serin Austausch im Nukleotid 187, wurde in primären Tumoren und Tumorzelllinien detektiert. Heterozygote Individuen für ⁶⁰⁹T besitzen eine geringere NQO1-Aktivität als Träger des Wildtyps, während homozygote Individuen keine Aktivität zeigen [241]. Die Inzidenz für diesen

Polymorphismus beträgt ca. 50 % in der Bevölkerung, 2-20 % davon zeigen Homozygotie [235]. Null-Polymorphismen wurden bei Patienten mit Tumoren der Lunge, Niere, Prostata und des Gastrointestinaltraktes detektiert [238].

1.5.2.3 BIOTRANSFORMATIONSREAKTIONEN

Die hNQO1-1 katalysiert die Detoxifikation von Quinonen zu Hydroquinonen in einer 2-Elektronen-Reduktionsreaktion unter Verwendung von NADH oder NAD(P)H als reduzierende Kofaktoren ($Q + NAD(P)H + H^+ \rightarrow QH_2 + NAD(P)^+$). Dabei werden stabilere Verbindungen gebildet, die Substrate für weitere Phase II-Konjugationsreaktionen mit GSH oder Glucuronsäuren darstellen und anschließend aus der Zelle ausgeschleust werden können [242]. Dieser Prozess umgeht die Bildung potenziell toxischer Semiquinonradikal-Intermediate und schützt somit die Zellen gegen Quinon-induzierten oxidativen Stress, Zytotoxizität und Mutagenität [243-245]. Die hNQO1-1 wird somit als Teil des antioxidativen Schutzsystems des Menschen betrachtet.

Substrate der hNQO1-1 sind Quinon-Verbindungen. Der Mensch ist gegenüber diesen Verbindungen entweder über die Aufnahme von natürlich vorkommenden Quinonen mit der Nahrung, die als Nebenprodukte in Pflanzen und Gemüse entstehen, oder über Umweltkontaminanten, die während Verbrennungsprozessen entstehen, exponiert. Neben den exogenen, hoch reaktiven B(a)P-Quinonen zählen auch die endogen gebildeten Catecholestrogen-Quinone aus dem Steroidhormon-Metabolismus dazu. Diese können im 1-Elektron-Redoxcycling radikalische Semiquinone bilden, die wiederum die Bildung von Superoxid-Anionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikalen durch die Fenton-Reaktion induzieren [17;246]. Den genotoxischen Effekten dieser Quinone kann durch die Induktion der hNQO1-1 entgegengewirkt werden [242;245].

1.5.2.4 REGULATION UND INDUZIERBARKEIT DER NAP(P)H: QUINON OXIDOREDUKTASE

Die hNQO1-Aktivität ist durch bifunktionale Induktoren, die neben Phase II-Enzymen auch die Expression von Phase I-Enzymen erhöhen, und durch monofunktionale Induktoren, die ausschließlich Phase II-Enzyme erhöhen, induzierbar [247]. Zu der letztgenannten Gruppe gehören ernährungsrelevante Substanzen wie z. B. Isothiocyanate [248;249], antioxidative Phenole [250], Flavonole [251] und Isoflavone [252;253].

Die hNQO1-1 Expression scheint transkriptionell reguliert zu sein [254]. Die Promotorregion (**Abbildung 1.11**) besitzt ein ARE [236]. Die ARE-Sequenz, die eine AP-1 Bindungsstelle und eine GCA-Box enthält, ist entscheidend für die basale und induzierte Expression der *hNQO1* [236]. Der Induktions-Pathway ist unbekannt, aber es könnte

möglicherweise ein zytosolisches Redoxsignal involviert sein, das die Expression und/oder die Interaktion der Transkriptionsfaktoren wie z. B. Jun, Nrf, Maf, Fos mit der ARE verändert [243;255]. Ein NF- κ B Element kann ebenso an der Induktion beteiligt sein [256].

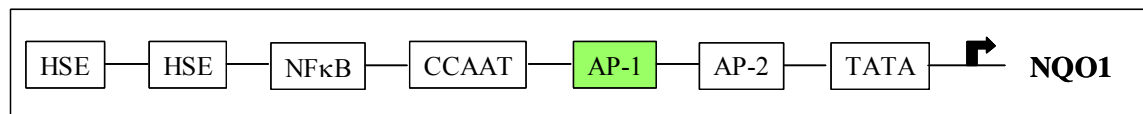


Abbildung 1.11: Struktur des hNQO1 Promoters (nach [256;257])

2 PROBLEM- UND AUFGABENSTELLUNG

Der Zusammenhang zwischen der Ernährungsweise und der hohen Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms in Nordamerika und Westeuropa im Vergleich zu der geringen Prävalenz in Ländern Asiens und Nordeuropa wird seit langem diskutiert. Epidemiologische Studien geben Hinweise darauf, dass eine Ernährung mit hohem Anteil an Soja- und Vollkornprodukten protektiv auf die Mammakarzinogenese wirkt. In zahlreichen klinischen und zellbiologischen Studien wurde bestätigt, dass die protektiven Effekte den in diesen Lebensmitteln enthaltenen pflanzlichen Estrogenen, den Phytoestrogenen, zuzuschreiben sind. Bedeutende, durch sekundäre Pflanzenstoffe vermittelte Wirkmechanismen in der Krebsprävention sind die Hemmung des Zellwachstums entarteter Zellen sowie die Induktion körpereigener Schutzsysteme, zu denen die Glutathion S-Transferasen (GST) und die NAD(P)H: Quinonoxidoreduktase (NQO1) als wichtige Phase II-Enzyme gehören.

Das Ziel der Arbeit war es, potenzielle präventive Effekte der Phytoestrogene, speziell Isoflavone, Lignane sowie deren bakterieller Darmmetabolite, in der Brustkrebs-Initiation unter Verwendung von *in vitro*-Zellmodellen zu bestimmen. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden an den epithelialen, dysplastischen MCF-10A Zellen durchgeführt, welche ein frühes Stadium des Karzinogeneseprozesses repräsentieren und somit ein geeignetes Modell für Untersuchungen von Mechanismen der Chemoprävention darstellen. Zum Vergleich der Wirkungen wurden die MCF-7 Zellen, ein gut etabliertes Tumorzellmodell, in die Experimente einbezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

1. Bewertung der Sensitivität der Zellmodelle unterschiedlichen Transformationsgrades gegenüber für die Mammakarzinogenese bedeutenden protektiven Faktoren und ausgewählten Risikofaktoren
 - Bestimmung der biologischen Aktivität der Phytoestrogene, deren bakterieller Metabolite sowie eines physiologisch relevanten Isoflavon-Gemisches anhand der Endpunkte Zellproliferation (DNA-Gehalt und DNA-Synthese) und metabolische Aktivität (mitochondriale und Gesamt-Enzymaktivität)
 - Bestimmung der Empfindlichkeit hinsichtlich DNA-Schädigung (Anzahl der Strangbrüche) unter Verwendung der genotoxischen Substanzen E2, 4-OH-E2, H₂O₂, HNE, B(a)P, BPDE und Menadion

2. Ermittlung der Mechanismen, die den Sensitivitätsunterschieden zugrunde liegen und Einfluss in der Primärprävention haben
 - Screening der Genexpression von Fremstoffmetabolismus- und oxidativen Stress-assoziierten Enzymsystemen mittels cDNA-Array-Technik und Vergleich der Zelllinien
 - Statuserfassung der für die Detoxifikation von endogenen und exogenen Brustkrebs-Risikofaktoren bedeutenden Phase II-Enzymsysteme GST und NQO1
 - Als Parameter für den GST-Status sollten die Genexpression (u. a. *hGSTA4*, *hGSTP1*), die Proteinexpression der zytosolischen GST-Isoenzyme (hGSTA1/2, A4-4, M1-1, M2-2 und P1-1) sowie die GST-Aktivität gegenüber CDNB bestimmt werden. Bei fehlender Proteinexpression für hGSTM1-1 sollte die Nulldeletion und für hGSTP1-1 der Polymorphismus durch Genotypisierung der DNA überprüft werden.
 - Als Parameter für den NQO1-Status sollten die Genexpression, die Proteinexpression und NQO1-Aktivität bestimmt werden.
3. Bestimmung der Wirkung der biologisch aktivsten Isoflavone und Lignane auf die Induzierbarkeit der Phase II-Enzyme in humanen Mammazellen
 - Modulation der differenziellen Genexpression
 - Charakterisierung der Modulierbarkeit der hGSTA4 und hGSTP1 auf mRNA-, Protein-, und Aktivitäts-Ebene. Dabei sollten GST-Protein und GST-Aktivität sowohl auf den zytosolischen Proteingehalt als auch auf die Zellzahl bezogen werden, um den Einfluss der Substanzen auf den Proteingehalt einbeziehen zu können.
 - Charakterisierung der Modulierbarkeit der hNQO1 auf mRNA-, Protein-, und Aktivitäts-Ebene.
4. Untersuchung des Einflusses eines erhöhten Phase II-Enzymstatus (GST, NQO1) auf die Chemosensitivität der Zellen gegenüber potenziellen Karzinogenen, um die Enzym-Induktion hinsichtlich protektiver Wirkungen zu beurteilen
 - Induktion der Phase II-Enzyme unter Verwendung des stärksten GST- bzw. NQO1-Induktors in beiden Zelllinien mit anschließender Behandlung der Zellen mit den genotoxischen Substanzen HNE, BPDE und Menadion
5. Im abschließenden Teil der Arbeit sollte die Bioverfügbarkeit der Phytoestrogene am Beispiel der zellulären Aufnahme des effektivsten Induktors bestimmt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 HUMANE MAMMAZELLMODELLE

Zur Bearbeitung der Aufgabenstellungen der vorliegenden Arbeit wurden zwei permanente, adhärent wachsende humane Mammazelllinien mit unterschiedlichem Transformationsgrad und Estrogenrezeptorstatus verwendet.

Die dysplastische Zelllinie MCF-10A (**Abbildung 3.1**) entstammt aus dem Brustepithel einer 36-jährigen Frau (Prämenopause) mit zystischer Fibrose (Mukoviszidose), aber ohne Familiengeschichte hinsichtlich maligner Brusterkrankung [258]. Die Zellen sind spontan immortalisiert und wurden durch Langzeit-Kultur in serumfreien Medium mit niedriger Ca^{2+} -Konzentration etabliert. Sie stellen nicht-transformierte Zellen dar und sind somit ein geeignetes Modell für Untersuchungen chemopräventiver Mechanismen. Die stark transformierte MCF-7 Zelllinie wurde aus einer pleuralen Effusion einer 69-jährigen kaukasischen Patientin (Postmenopause) mit metastasierenden Brustkrebs gewonnen (**Abbildung 3.1**) [259]. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der beiden Zelllinien basiert auf der ER-Expression. Während MCF-10A nur eine marginale ER β -Expression aufweisen, sind MCF-7 sowohl ER α - als auch ER β -positiv [260].

Beide Zelllinien wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. I. Rowland von der University of Ulster (Nord-Irland) für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

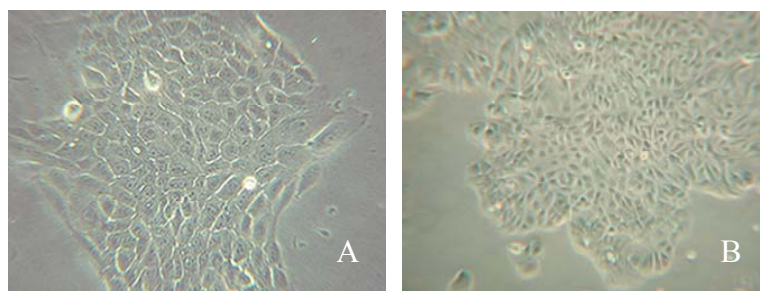


Abbildung 3.1: Morphologie der (A) MCF-10A und (B) MCF-7 Mammazelllinien (5x Vergrößerung)

3.1.2 TESTSUBSTANZEN

In **Tabelle 3.1** ist die Herstellung der in der Arbeit verwendeten Stammlösungen der Isoflavone und Lignane dargestellt.

Tabelle 3.1: Herstellung der verwendeten Isoflavon- und Lignan-Stammlösungen

Substanz	Molmasse (g/mol)	Endkonzentration (mM)	Herstellung
Genistein (GEN)	270,24	100	27 mg + 1000 µl DMSO
Dihydrogenistein (DHGEN)	272,00	100	2 mg + 73,5 µl DMSO
6-Hydroxy- <i>O</i> -Demethylangolensin (6-OH- <i>O</i> -DMA)	274,27	100	5 mg + 190 µl DMSO
Daidzein (DAI)	254,25	100	25 mg + 1000 µl DMSO
Dihydrodaidzein (DHDAI)	256,00	100	2 mg + 78,1 µl DMSO
<i>O</i> -Demethylangolensin (<i>O</i> -DMA)	258,27	100	2 mg + 77,5 µl DMSO
R,S-Equol (EQU)	242,27	100	5 mg + 207 µl DMSO
S-Equol (S-EQU)	242,27	50	5 mg + 413 µl DMSO
Synthetisches Gemisch (Mix (EQU))		100	64 µl GEN, 29 µl DAI, 7 µl EQU
Substanz	Molmasse (g/mol)	Endkonzentration (mM)	Herstellung
Enterolacton (ENL)	298,34	100	5 mg + 168 µl DMSO
Enterodiol (END)	302,37	100	5 mg + 166 µl DMSO

Die Stammlösungen wurden aliquotiert und bei –20°C gelagert. Die Gebrauchslösungen wurden in phenolrotfreien Medium angesetzt. Für die MCF-7-Zellkultur wurde dem Medium Charcoal-stripped FCS (CCS) supplementiert. MCF-10A-Zellen dagegen wuchsen unter serumfreien Bedingungen.

In **Tabelle 3.2** ist die Herstellung der in der Arbeit verwendeten Stammlösungen der kanzerogenen Verbindungen zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Herstellung der Lösungen der verwendeten kanzerogenen Substanzen

Substanz	Molmasse (g/mol)	Endkonzentration (mM)	Herstellung
17β-Estradiol (E2)	272,40	100	27 mg + 1000 µl DMSO
2-Hydroxy-Estradiol (2-OH-E2)	288,40	100	5 mg + 173,4 µl DMSO
4-Hydroxy-Estradiol (4-OH-E2)	288,40	100	5 mg + 173,4 µl DMSO
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)		9,79 M (30 %)	
4-Hydroxy-2-nonenal (HNE)	230,00	7	3,2 mg + 2000 µl HCl (0,1 %)
Benzo(a)pyren (B(a)P)	252,32	100	25,2 mg + 1000 µl DMSO
Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	302,33	100	2 mg + 66,2 µl DMSO
Menadion	172,20	20	3,4 mg + 1000 µl DMSO

Die Stammlösungen wurden aliquotiert und bei –20°C gelagert. Die Gebrauchslösungen für die Comet Assay-Experimente wurden in phenolrotfreien RPMI angesetzt.

HNE-Dimethylacetat wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. E. Eder (Institut für Toxikologie der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt, aus dem das benötigte HNE selbst hergestellt werden konnte. Der große Vorteil dabei lag in der freien

Wahl des Lösungsmittels und in der freien Wahl der HNE-Konzentration in der Stammlösung. Die Überprüfung der HNE-Konzentration in der Stammlösung erfolgte vor jedem Experiment mittels Spektrometrie.

Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen und deren getestete Konzentrationsbereiche unter Verwendung verschiedener Techniken.

Tabelle 3.3: Konzentrationsbereiche der verwendeten Testsubstanzen

Substanz	Konzentration (µM)					
	DAPI	BrdU	MTT	CellTiter-Blue®	Gen-, Protein-expression	Comet Assay
Isoflavone	0,1-80	0,1-80	0,1-40	0,1-40	1-30	1-80
Mix	0,1-40	-	0,1-40	-	-	-
Lignane	0,1-80	-	-	-	1-30	1-80
Estrogene	0,1-80	0,1-80	0,1-40	0,1-40	-	0,001-1000 (E2), 0,01-1 (4-OH-E2)
H ₂ O ₂	-	-	-	-	-	4,5-150
HNE	-	-	-	-	-	25-150
B(a)P	-	-	-	-	-	10-200
BPDE	-	-	-	-	-	1-100
Menadion	-	-	-	-	-	0,25-10

3.1.3 SONSTIGES

Die verwendeten Geräte, Arbeitsmittel, Chemikalien und Reagenzien (einschließlich Proteinstandards und Antikörper) sowie die Rezepturen der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien und die Mess- und Auswertungssoftware sind im **Anhang I** aufgeführt.

3.2 METHODEN

3.2.1 ZELLBIOLOGISCHE TECHNIKEN

3.2.1.1 ZELLKULTUR

Die Brustzelllinien wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37°C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur vortemperierte. In regelmäßigen Abständen wurde ein Mykoplasmen-DNA-Amplifikationstest auf Basis einer PCR (Mycoplasma-PCR-Detection-Kit VenorGeM, Minerva Biolabs) durchgeführt.

Die MCF-10A Zellen wurden als Adhäsionskulturen in Zellkulturflaschen (25 cm² bzw. 75 cm²) in Mammary Epithelial Growth Medium (MEGM) kultiviert, dem 100 ng/ml Cholera toxin zugesetzt war. Alle 3-4 Tage wurde das Medium gewechselt und beim

Erreichen von 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das alte Medium vollständig entfernt und die Zellen mit 1,5 ml (25 cm²) bzw. 3 ml (75 cm²) PBS/EDTA-Lösung für 4 min und anschließend mit 10x Trypsinlösung (1,5 ml bzw. 3 ml) weitere 4 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinwirkung wurde nach Ablösen der Zellen durch Zugabe von PBS+BSA inaktiviert. Nach anschließender Zentrifugation (300 g, 3 min) wurde das Zellpellet in phenolrothaltigem Zellkulturmedium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:4 subkultiviert. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 1-27 verwendet.

Die permanente Zelllinie MCF-7 wurde unter standardisierten Bedingungen in DMEM mit 1 % nichtessentiellen Aminosäuren, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS in 25 cm² bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Alle 3-4 Tage fand ein Mediumwechsel statt und wenn die Zellkulturflasche subkonfluent bewachsen war, wurden die Zellen subkultiviert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zunächst mit PBS/EDTA-Lösung gespült und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung (1,5 ml bzw. 3 ml) 4 min bei 37°C inkubiert. Nach Aufnahme der erhaltenen Zellsuspension in PBS+BSA wurden die Zellen abzentrifugiert (300 g, 3 min) und anschließend in Kulturmedium resuspendiert und erneut ausgesät. Es wurden Zellen der Passagen 1-45 verwendet.

Für die Experimente wurden die Zellen in phenolrotfreiem Medium ausgesät. MCF-7 Zellmedium wurde in der Anwachsphase noch mit FCS angereichert. 24 h vor dem Experiment wurde das alte Medium durch frisches phenolrotfreies Medium, im Falle der MCF-7 Zellen supplementiert mit CCS, ersetzt, um potenziell estrogene Verbindungen des Mediums und Serums zu eliminieren.

3.2.1.2 ZELLZAHL- UND VITALITÄTSBESTIMMUNG

Eine Standardmethode zur Ermittlung von Zellzahl und Vitalität ist der Trypanblau-Ausschlusstest. Er basiert auf dem Prinzip, dass tote, membrangeschädigte Zellen den Farbstoff Trypanblau inkorporieren, vitale Zellen ihn aber aufgrund der intakten Zytoplasmamembran ausschließen. So erscheinen vitale Zellen unter dem Mikroskop ungefärbt und sind von den toten, blau gefärbten Zellen zu unterscheiden [261].

Für die Bestimmung von Zellzahl und Vitalität wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau-Lösung versetzt und auf eine geeichte Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Zellzahl wurde durch Auszählen vitaler und toter Zellen von mindestens 4 Großquadraten unter dem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung ermittelt. Als Berechnungsgrundlage für die Bestimmung der Zellzahl in 1 ml Zellsuspension diene folgende Gleichung:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Zellzahl / Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die Vitalität der Zellen berechnete sich nach folgender Gleichung:

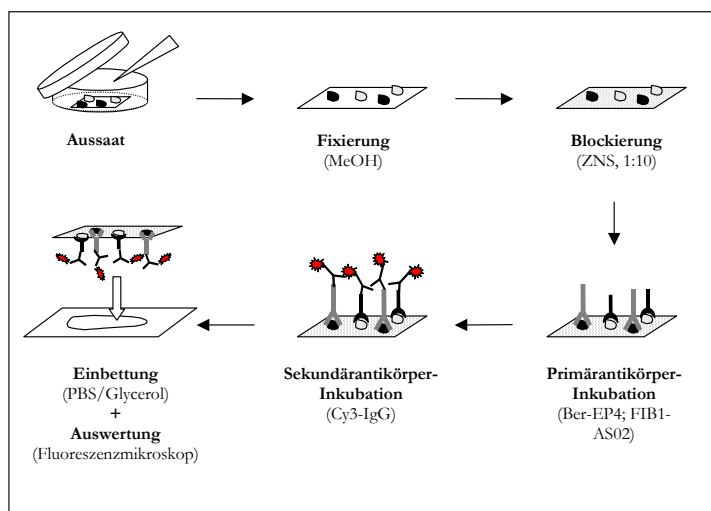
$$\text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{Anzahl vitaler Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

3.2.1.3 EPITHELZELLNACHWEIS MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZ

Zur Charakterisierung der verwendeten Zelllinien hinsichtlich ihrer zellulären Herkunft wurden monoklonale Antikörper (mAK) zum Nachweis epithelialer (Ep-CAM) und fibroblastenspezifischer (Thy-1/CD90) Oberflächenantigene eingesetzt [262;263]. Die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte über einen Fluorochrom (Cy3)-markierten Sekundärantikörper. In **Abbildung 3.2** ist das Prinzip dieser als indirekte Immunfluoreszenz bezeichneten Methode schematisch dargestellt.

Abbildung 3.2: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

Nach Aussaat und Kultivierung der Zellen auf Deckgläschen wurden sie für 10 min in eiskaltem Methanol fixiert und anschließend 1 h an der Luft getrocknet. Die luftgetrockneten Präparate wurden anschließend in PBS equilibriert und für 30 min in



Ziege-Normalserum (ZNS; 1:10 in PBS) blockiert. Die Bindung des Primärantikörpers (Ber-EP4 (1 µg/ml) bzw. FIB1-AS02 (1 µg/ml) in 0,5 % (w/v) PBS+BSA) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Präparate mit Cy3-markiertem Ziege-Anti-Maus IgG (7 µg/ml in 0,5 % (w/v) PBS+BSA) für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen (3 x 5 min mit PBS), bevor die Präparate in 80 % Glycerol in PBS auf einen Objektträger eingebettet und versiegelt wurden. Die Auswertung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 100M) unter Verwendung eines Grünlichtfilters (Zeiss 015; $\lambda = 546$ nm).

3.2.1.4 KARYOTYPISIERUNG DER MCF-10A UND MCF-7 ZELLEN MITTELS 24-FARBEN-FISH

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die dysplastischen MCF-10A Zellen sowie für die MCF-7 Karzinomzellen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. U. Claussen (Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena) die Karyotypen bestimmt. Dafür wurde die Methode des 24-Farben-FISH verwendet [264;265]. Mit dieser Methode wurde jedes der 24

Chromosomen (22 Autosomen, X, X) mit einer spezifischen Kombination von Fluorochromen (SpectrumGreen, TexasRed, SpectrumOrange, Biotin und Digoxigenin) gelabelt, was eine eindeutige Identifikation des Ursprungs des chromosomalen Materials erlaubt. Zudem wurde das multitude (one-step) Multicolor Chromosome Banding (mMCB) zur exakten Bruchpunktbestimmung aberranter Chromosomen, unter Verwendung der MCF-10A Zellen entwickelt [265].

Es wurden für die MCF-10A 10 und für die MCF-7 4 Metaphasen ausgewertet.

3.2.1.5 WACHSTUMSKINETIK

Um das Wachstumsverhalten der Brustkrebszellen in Kultur zu charakterisieren, wurde eine Wachstumskinetik unter Standardkulturbedingungen erstellt. Aus der Zunahme der Zellzahl über die Zeit resultiert eine Wachstumskurve, aus der sich die exponentielle Wachstumsphase und Verdopplungszeit der Zellen ableiten lassen.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 pro Kavität in einer 12-well-MTP ausgesät. Nach einer Anwuchsphase von 24 h fand ein Mediumwechsel statt und die Anheftungsrate (t_0 ; = % adhärenzte Zellen an der Ausgangszellzahl) wurde ermittelt. Alle weiteren 24 h wurde die Zellzahl von je 3 Kavitäten (t_{24} - t_{168}) bestimmt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte wie unter 3.2.1.2. beschrieben. Als Berechnungsgrundlage für die Anzahl der Generationen diente folgende Gleichung [266]:

$$\text{Generationen} = \frac{\ln(N_b) - \ln(N_a)}{\ln 2}$$

(N_b und N_a ist definiert als Zellzahl zu den Zeitpunkten t_b und t_a ($t_b > t_a$) in der logarithmischen Wachstumsphase)

Die Berechnung der Verdopplungszeit der Zellen erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{Verdopplungszeit} = \frac{t_b - t_a}{\text{Generationen}}$$

3.2.1.6 ZELLPROLIFERATIONSTESTS

3.2.1.6.1 DNA-FÄRBUNG MITTELS DAPI

Die Quantifizierung des DNA-Gehaltes als Maß für die Zellzahl beruht auf der Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes 4',6'-diamidino-2'-phenylindole hydrochloride (DAPI) mit Adenin-Thymin-Sequenzen im DNA-Doppelstrang [267]. Das Fluorochrom emittiert nach Anregung durch kurzwelliges Licht der Wellenlänge $\lambda = 360$ nm energieärmeres, längerwelliges Licht ($\lambda = 465$ nm). Die detektierte Fluoreszenz kann als Parameter für den DNA-Gehalt und die Zellzahl herangezogen werden, da zwischen der Fluoreszenzintensität und dem DNA-Gehalt eine positive lineare Korrelation besteht [267].

Nach definierter Zellaussaat (3000 Zellen/Kavität) in 96-well-MTPs wurden MCF-10A und MCF-7 Zellen 48 h vorinkubiert. 24 h nach dem Mediumwechsel auf estrogen-depletiertes Medium erfolgte die Inkubation mit der jeweiligen Testsubstanz (**Tabelle 3.3**). Nach Ablauf der Inkubationsdauer (24 h, 48 h, 72 h) wurde der Mediumüberstand entfernt, die Zellen mit Methanol (100 µl/Kavität) fixiert und permeabilisiert und nach 15-minütiger Trocknungsphase mit DAPI (20 µM; 100 µl/Kavität) inkubiert. Der DNA-DAPI-Komplex wurde fluoreszenzphotometrisch (Ex/Em 360 nm/465 nm) gemessen. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,1 % DMSO. Die Fluoreszenzen DMSO-behandelter Zellen wurden für die Kalkulation 100 % gesetzt.

3.2.1.6.2 BESTIMMUNG DER DNA-SYNTHESELEISTUNG

Zelluläre Proliferation erfordert die Replikation der DNA. Somit ist die Untersuchung der Regulation der DNA-Synthese ein indirekter Parameter zur Ermittlung der Zellproliferation. Der Einfluss der Testsubstanzen auf die DNA-Synthese der MCF-10A und MCF-7 Zellen wurde mit dem Cell-Proliferation-ELISA BrdU (Chemilumineszenz) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) untersucht. Die Methode beruht auf dem Einbau von 5-Bromo-2'-desoxyuridine (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen, welches über zelluläre Enzymimmunoassays unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen BrdU detektiert wird [268;269]. Der BrdU-Einbau ist dabei direkt proportional zur Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen.

MCF-10A und MCF-7 Zellen wurden wie unter **3.2.1.6.1** beschrieben ausgesät und kultiviert und mit den Testsubstanzen GEN, EQU und E2 für 24 h, 48 h und 72 h behandelt (**Tabelle 3.3**). BrdU wurde 2 h vor dem Inkubationsende zupipettiert. Nach anschließendem Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert, Antikörper zugesetzt und der Immunkomplex nach erfolgter Substratreaktion mittels Chemilumineszenz detektiert (Hersteller-Protokoll). Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO (0,1 %).

3.2.1.7 BESTIMMUNG DER METABOLISCHEN AKTIVITÄT

Die Techniken zur Bestimmung der metabolischen Aktivität dienen ausschließlich der Bewertung der Zellvitalität nach abgeschlossener Behandlung mit den Testsubstanzen. Dabei wird nicht zwischen sich aktiv teilenden bzw. ruhenden Zellen unterschieden.

3.2.1.7.1 BESTIMMUNG DER MITOCHONDRIALEN AKTIVITÄT

Die mitochondriale Aktivität wurde mit Hilfe des MTT Assays, erstmals beschrieben von Mosmann [270] und modifiziert nach Carmichael *et al.* [271], bestimmt. Er basiert auf der zellulären Reduktion des Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-

tetrazolium bromide (MTT) durch NAD-abhängige Dehydrogenasen zum Formazan, welches bei 570 nm photometrisch detektiert wird. Dabei korreliert die Menge des gebildeten Farbstoffes und damit die Absorption direkt proportional mit der Anzahl lebender Zellen.

MCF-10A und MCF-7 Zellen wurden wie unter **3.2.1.6.1** beschrieben ausgesät, kultiviert und inkubiert (GEN, 6-OH-O-DMA, DAI, O-DMA, EQU, S-EQU, MIX, ENL, E2 und 4-OH-E2, **Tabelle 3.3**). DMSO (0,1 %) wurde als Lösungsmittelkontrolle eingesetzt. Am Ende des Experimentes wurde das Medium mit den Testsubstanzen entfernt, die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und frisches Medium zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit MTT-Lösung (15 µl/well) für 4 h bei 37°C und danach mit Lösungsvermittler, zum Lösen der wasserunlöslichen, dunkelblauen Formazan-Kristalle, über Nacht bei 37°C inkubiert (Hersteller-Protokoll, Promega, Southhampton, UK). Die Absorption wurde bei 570 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) photometrisch bestimmt.

3.2.1.7.2 BESTIMMUNG DER ZELLULÄREN METABOLISCHEN AKTIVITÄT

Ein weiterer *in vitro*-Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen ist der sogenannte CellTiter-Blue® Assay. Diese Methode beruht auf der Fähigkeit vitaler Zellen, den Farbstoff Resazurin in Resorufin umzuwandeln, der fluoreszenzphotometrisch bestimmt wird. Die Fluoreszenz ist direkt proportional zur Lebendzellzahl.

Die MCF-10A und MCF-7 Zellen wurden in 96-well-MTPs kultiviert (**Kapitel 3.2.1.6.1**) und mit GEN, EQU, E2 und 4-OH-E2 (**Tabelle 3.3**) sowie DMSO (0,1%) für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. CellTiter-Blue® Reagenz wurde 2 h vor Beendigung des Experimentes zupipettiert. Die Bildung von Resorufin wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzphotometers (Ex/Em 520 nm/595 nm) detektiert (Hersteller-Protokoll, Promega, Southhampton, UK).

3.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.2.1 BESTIMMUNG DER STEADY-STATE mRNA EXPRESSION DER GST-ISOENZYME

3.2.2.1.1 ISOLIERUNG DER GESAMT-RNA AUS DEN ZELLEN

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus den jeweiligen Zellkulturen, die für die Basis-Expressions-Analysen verwendet wurden, erfolgte mit TRIzol®-Reagenz, einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat [272].

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen durch Zugabe von TRIzol®-Reagenz (1 ml/25 cm²-Kulturflasche) lysiert. Durch Extraktion mit Chloroform (0,2 ml, 15 sec schütteln, 3 min RT) und anschließende Zentrifugation (16000 g, 5 min, 4°C) wurde eine Separierung des Lysats in drei Phasen erreicht. Zur Fällung der RNA wurde die obere, wässrige Phase von der organischen Phase sowie der Interphase abgetrennt, mit Isopropanol

versetzt (0,5 ml, 1 min, RT) und anschließend zentrifugiert (16.000 g, 20 min, 4°C). Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 75 % Ethanol (200 µl) gewaschen, erneut zentrifugiert (16000 g, 5 min, 4°C) und luftgetrocknet. Danach wurde die RNA in sterilem DMPC-H₂O (50 µl) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die Isolierung der mRNA aus den jeweiligen Zellkulturen, die zur Durchführung der cDNA-Arrays und der quantitativen real-time RT-PCR eingesetzt wurde, erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (RNeasy Mini Kit, Quiagen, Hilden).

3.2.2.1.2 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES RNA-GEHALTES

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte im UV-Spektrophotometer und beruht auf der spezifischen Absorption der Nukleinsäurebasen bei 260 nm. Dabei entspricht die OD (Optische Dichte)-Einheit (260 nm) einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Die folgende Formel diente zur Berechnung der RNA- Konzentration:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt den Reinheitsgrad der RNA an und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Werte < 1,8 weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. Für jede RNA-Probe wurde eine Doppelbestimmung (1:100 Verdünnung mit DMPC-H₂O) durchgeführt und die Werte im Anschluss gemittelt.

3.2.2.1.3 DENATURIERENDE RNA-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die isolierte RNA wurde zur Überprüfung ihrer Integrität mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Denaturierung wurden Formamid und Formaldehyd verwendet. Für die Beladung des Gels wurden je 5 µl RNA-Lösung mit 5 µl RNA-Auftragspuffer vermischt, 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf ein 1,5 %-iges MOPS-Agarose-Gel, dem Formaldehydlösung zugesetzt wurde, aufgetragen. Das Gel wurde mit 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer überschichtet. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug 3 h bei 70 V angelegter Spannung. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht mit dem BioRad-MultimanagerS (Programm: Quantity OneTM; Blende 5,6; Expositionszeit 10 sec) fotografiert. Die Intaktheit der RNA wurde visuell anhand der scharfen Banden der ribosomalen RNA (28S- und 18S-Bande) kontrolliert.

3.2.2.1.4 SEMIQUANTITATIVE REVERSE TRANSKRIPTASE-POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-PCR)

Eine sensitive Methode zur Untersuchung der Genexpression auf mRNA-Ebene stellt die semiquantitative Reverse Transkriptase (RT)-PCR dar, deren Prinzip auf der Amplifizierung der durch reverse Transkription in cDNA umgeschriebenen mRNA beruht.

Um eine mögliche Kontamination der eingesetzten RNA mit DNA auszuschließen, wurde vor der cDNA-Synthese ein DNA-Verdau unter Verwendung von DNase I, Amplification Grade durchgeführt (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Die Umschreibung der RNA (0,5-5 µg) in cDNA erfolgte unter Verwendung des Kits SuperScriptTM First-Strand Synthesis System (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern. Zur Überprüfung des Erfolgs des DNase-Verdau und der reversen Transkription wurden jeweils Kontroll-PCRs mit β -Aktin den Untersuchungen der GST Expression vorangestellt.

Die mRNA-Expression der GST-Isoenzyme in den Mammazelllinien wurde qualitativ mittels RT-PCR nachgewiesen. HT29 Kolonzellen dienten dabei als Positivkontrolle und β -Aktin, welches als Housekeeping Gen in den Brustzellen gut exprimiert wird, als interne PCR-Kontrolle. Zur Amplifikation wurden spezifische Intron-überspannende Primer verwendet. Die Primersequenzen basierten auf den mRNA-Sequenzen der NCBI Nukleotidsequenz-Datenbank für *hGSTA1* (NM_145740), *hGSTA2* (NM_000846), *hGSTA4* (NM_001512), *hGSTM1* (NM_000561), *hGSTM2* (NM_000848), *hGSTP1* (NM_000852), *hGSTT1* (NM_000853), *hGSTT2* (NM_000854) und *β -Aktin* (NM_001101) (**Anhang Tabelle 9.1**).

Für die Durchführung der PCR wurde zunächst ein Mastermix (**Tabelle 3.4**) angesetzt, der alle Reagenzien bis auf die cDNA enthielt. Zu jeweils 24 µl Mastermix wurde 1 µl cDNA von Mammazellen, HT29 Zellen (Positivkontrolle) bzw. 1 µl dd H₂O (Negativkontrolle) pipettiert.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Mastermixes (1x Ansatz) für die RT-PCR

cDNA (10 ng Gesamt-RNA)	10 x PCR-Puffer	dNTPs (10 mM)	Primer (forward/revers) (10 pmol/µl)	Taq Polymerase (5 U/µl)	dd H ₂ O
1 µl	2,5 µl	1 µl	je 1 µl	0,2 µl	18,3 µl

Die GSTs und β -Aktin wurden anschließend in 38 Zyklen amplifiziert (**Tabelle 3.5**).

Tabelle 3.5: PCR-Bedingungen für GST-Isoenzyme und β -Aktin

PCR-Schritte	Reaktion	Bedingungen
1	Heizdeckeltemperatur	105°C
2	Einmalige Denaturierung	95°C 15 min
3	Denaturierung	94°C 30 sec
4	Hybridisierung/Annealing	55°C (A1, A2) ; 60°C (M1, M2, P1) ; 63°C (A4, T1, T2) 30 sec
5	Extension	72°C 60 sec
6	Finale Extension	72°C 10 min
7	Kühlung	4°C ~

3.2.2.1.5 GELELEKTROPHORESE UND AUSWERTUNG

Die Auftrennung der amplifizierten DNA erfolgte nach der Fragmentlänge in einem 2%-igen TAE-Agarose-Gel, dem Ethidiumbromid (3 µl/50 ml) zugesetzt war. Die PCR-Produkte wurden mit Auftragspuffer (5 µl Produkt + 1 µl Puffer) vermischt, aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (120 V, 40 min). Für den Vergleich der Fragmentlängen wurde ein DNA-Längenstandard (100 bp) mitgeführt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht mit dem BioRad-MultimanagerS (Programm: Quantity OneTM; Blende 5,6; Expositionszeit 45 sec) fotografiert. Die Auswertung der Banden erfolgte visuell durch Abschätzen der Größe der DNA-Fragmente anhand des DNA-Längenstandards.

3.2.2.2 GENOTYPISIERUNG DER MAMMA-ZELLINIEN

3.2.2.2.1 ISOLIERUNG VON GESAMT-DNA AUS DEN ZELLEN

Zur Isolierung der DNA wurde der QIAamp DNA Mini Kit 250 (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet. Dabei wurde die DNA in einer Säule an eine Membran adsorbiert. In mehreren nachfolgenden Waschschritten wurden die übrigen Zellbestandteile entfernt. Abschließend wurde die DNA von der Säule eluiert. Das Eluat wurde bei -20°C eingefroren.

3.2.2.2.2 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES DNA-GEHALTES

Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach der aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz abgeleiteten Formel:

$$\text{DNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Bewertung des Reinheitsgrads der DNA diente der Quotient aus A_{260}/A_{280} . Für reine DNA-Lösungen sollte der Quotient bei 1,8 liegen. Kleinere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen, größere Werte auf das Vorhandensein von RNA hin. Für jede DNA-Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und die Werte im Anschluss gemittelt.

3.2.2.2.3 MULTIPLEX-PCR FÜR *HGSTMI*, *HGSTTI* UND β -GLOBIN

Der Untersuchung der Nullpolymorphismen der kodierenden Gene für *hGSTM1*-1 und *hGSTT1*-1 erfolgte mittels Multiplex-PCR, bei welcher mit Hilfe von drei spezifischen Primerpaaren die Amplikons für *hGSTM1* (215 bp), *hGSTT1* (480 bp) und β -Globin (268 bp) in einem PCR-Ansatz gleichzeitig generiert wurden [273-275]. Das Housekeeping Gen β -Globin wurde als interne PCR-Kontrolle mitamplifiziert. Zur Amplifikation wurden die im **Anhang Tabelle 9.2** aufgeführten Oligonukleotid-Sequenzen verwendet.

Für die Durchführung der PCR wurde zunächst ein Mastermix (**Tabelle 3.6**) angesetzt, der alle Reagenzien bis auf die cDNA enthielt. Zu jeweils 29 µl Mastermix wurde 1 µl DNA von Mammazellen, HT29 (Positivkontrolle) bzw. 1 µl dd H₂O (Negativkontrolle) pipettiert.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Mastermixes (1x Ansatz) für die Multiplex-PCR

DNA (30-100 ng)	10 x PCR-Puffer	dNTPs (5 mM)	Primer GSTM1, GSTT1 (forward/revers) (10 pmol/µl)	Primer β-Globin (forward/revers) (10 pmol/µl)	Taq Polymerase (5 U/µl)	dd H ₂ O
1 µl	3 µl	3 µl	je 4 µl	je 2 µl	0,25 µl	2,75 µl

Im Anschluss erfolgte die Amplifikation in 30 Zyklen im Thermocycler (**Tabelle 3.7**).

Tabelle 3.7: PCR-Bedingungen für die Multiplex-PCR

PCR-Schritte	Reaktion	Bedingungen
1	Heizdeckeltemperatur	105°C
2	Einmalige Denaturierung	95°C 15 min
3	Denaturierung	94°C 60 sec
4	Hybridisierung/Annealing	60°C 60 sec
5	Extension	72°C 60 sec
6	Finale Extension	72°C 5 min
7	Kühlung	4°C ~

3.2.2.2.4 RFLP-PCR ZUM NACHWEIS DES *hGSTP1*-GENOTYPES

Der Nachweis der Punktmutation im Nukleotid 313 (A→G-Transition) des *hGSTP1*-Gens erfolgte mit Hilfe der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-PCR (RFLP-PCR) [276]. Zunächst wurde *hGSTP1* (176 bp) in einer PCR (**Kapitel 3.2.2.2.3**) amplifiziert. Zur Amplifikation wurden die im **Anhang Tabelle 9.3** aufgeführten Oligonukleotid-Sequenzen verwendet. Die DNA-Proben wurden im Anschluß entsprechend dem Hersteller-Protokoll einem Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *Alw 26 I* unterzogen. *Alw 26 I* schneidet das amplifizierte, 176 bp lange DNA-Fragment nur, wenn sich an Position 313 ein Guanin befindet. Es wird folglich nur das mutierte Allel geschnitten. Als Ergebnis erhält man zwei kleinere Fragmente mit 91 bp und 85 bp [276].

3.2.2.2.5 GELELEKTROPHORESE UND AUSWERTUNG

Die Agarose-Gelelektrophorese und fluoreszenzphotometrische Auswertung der Gele erfolgte wie im **Abschnitt 3.2.2.1.5** beschrieben.

3.2.2.3 cDNA ARRAYTECHNIK ZUR UNTERSUCHUNG DER GENEXPRESSION VON BIOTRANSFORMATIONS- UND STRESS RESPONSE-ENZYMEN IN MCF-10A UND MCF-7 ZELLEN

Mit der Nukleinsäuren-Arraytechnik ist es möglich, die Expression einer Vielzahl von Genen in einem einzigen Experiment zu untersuchen. Auf den in dieser Arbeit verwendeten

cDNA-Arrays (Human Drug Metabolism Gene Array; Human Stress & Toxicity Pathway Finder Gene Array) der Firma Superarray waren neben Blanks (6 Spots) und Housekeeping Genen (10 Spots) 192 Gene enthalten, die an der Metabolisierung und Detoxifizierung von Fremdstoffen sowie am oxidativen Stress-Metabolismus beteiligt sind (**Anhang Tabelle 9.4**).

3.2.2.3.1 *IN VITRO TRANSKRIPTION UND DOT-BLOT*

Das Umschreiben der RNA mit gleichzeitiger Biotin-Markierung erfolgte mit dem AMPOLabeling-Kit der Firma Superarray. Mit Hilfe von Random Primern und Reverser Transkriptase wurde RNA (3 µg) in cDNA umgebaut. Mit Gen-spezifischen Primern erfolgte dann die Amplifizierung der Transkripte mit gleichzeitigem Biotin-Einbau. Die Qualität der cDNA-Sonden wurde mittels Dot-Blot überprüft. Die Detektion des Biotins erfolgte nach der Anleitung des Herstellers (**Kapitel 3.2.2.3.2**).

3.2.2.3.2 *HYBRIDISIERUNG UND DETEKTION*

Nach einer Vorhybridisierung erfolgte die Hybridisierung der Membranen mit den denaturierten Sonden in „GEAhyb-Solution“ über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Membranen nach Anleitung des Herstellers gewaschen, bevor eine 60-minütige Blockierung („Blocking Solution“ inkl. Lachsspermien-DNA) erfolgte. Zum Nachweis des Biotins wurde Anti-Biotin-Alkalische Phosphatase (AP)-Antikörper eingesetzt (30 min Inkubation). Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Detektion der AP mit CDP-Star. Die Lumineszenz wurde über einen Röntgenfilm detektiert und mit einer CCD-Kamera fotografiert.

3.2.2.3.3 *AUSWERTUNG*

Die mittels CCD-Kamera erhaltenen Bilder wurden mit der AIDA Microarray Software (Fuji) densitometrisch ausgewertet. Die Rohdaten wurden durch die Differenz aus „Integral - Background“, die für jeden Spot erhalten wurde, charakterisiert. Zur Ermittlung der differentiellen Genexpression wurden die Rohdaten zwischen 0 und 100 % Expression normalisiert, wobei der Mittelwert der Negativkontrollen (Blanks) 0 % und der Mittelwert der Positivkontrollen (Housekeeping Gene: GAPDH, β -Aktin, PPIA, RPL13A) 100 % gesetzt wurde. Nach der Normalisierung wurden die Daten der Einzelversuche gemittelt. Als exprimiert galten Gene, deren Werte größer als der Mittelwert der maximalen Negativkontrollen plus deren 3-fachen Standardabweichung waren (> Cut off).

3.2.2.4 *QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR ZUR BESTIMMUNG DER *HGSTP1*, *HGSTA4* UND *HNQO1* MRNA EXPRESSION*

Die quantitative real-time RT-PCR, eine Weiterentwicklung der RT-PCR [277], ist eine sehr schnelle und sensitive Methode zur *in-vitro*-Amplifizierung spezifischer durch reverse

Transkription in cDNA umgeschriebener mRNA-Abschnitte und ermöglicht die Detektion kleinster RNA-Mengen. Dabei wird die Template-Menge (mRNA) während jedes PCR-Zyklus (real-time) quantifiziert, während die Standard-RT-PCR-Techniken das amplifizierte Genprodukt als Endpunktmessung bestimmen.

Das Prinzip der PCR-Reaktion basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der zwischen zwei Primern liegt. Beim TaqMan[®]-Assay liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonucleotid-Primern ein zusätzliches Oligonucleotid, die sogenannte TaqMan-Sonde. Diese ist mit einem am 5'-Ende liegenden Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (VIC) und einem am 3'-Ende liegenden Quencher (TAMRA) markiert. Die Reporterfluoreszenzemission wird bei der intakten TaqMan-Sonde durch die Nähe zum Quencher unterdrückt. Bei der Neustrang-synthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5'-Exonukleaseaktivität die TaqMan-Sonde in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Loslösung des Reporters vom Quencher kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt werden kann (**Abbildung 3.3**). Dabei steigt die Fluoreszenz proportional mit der Produktmenge an.

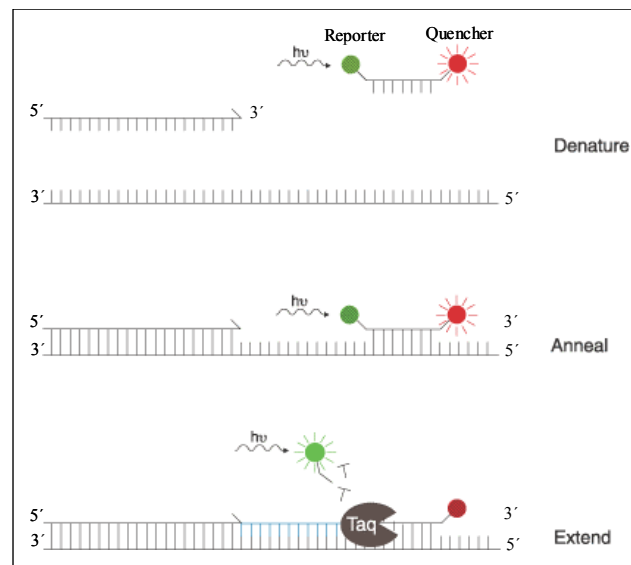


Abbildung 3.3: Prinzip der TaqMan Detektion

3.2.2.4.1 INKUBATION DER ZELLEN MIT GENISTEIN UND ISOLIERUNG DER GESAMT-RNA

Nach Zellaussaat ($0,4 \times 10^6$ Zellen/Kavität in 6-well-MTPs) und Vorinkubation wurden die MCF-10A und MCF-7 Zellen mit 0-30 μM GEN behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 8 h, 24 h und 48 h wurden aus den Zellen die RNA isoliert (**Kapitel 3.2.2.1.1**). Die RNA-Quantität und Qualität wurde photometrisch (**Kapitel 3.2.2.1.2**) und gelelektrophoretisch (**Kapitel 3.2.2.1.3**) überprüft.

3.2.2.4.2 REVERSE TRANSKRIPTION

Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des TaqMan[®] RT Reagents-Kits der Firma Applied Biosystems entsprechend den Hersteller-Angaben.

3.2.2.4.3 SEQUENZIERUNG DER GSTP1, GSTA4 UND NQO1 PCR-PRODUKTE

Der real-time RT-PCR Reaktion wurde eine normale RT-PCR (**Kapitel 3.2.2.1.4** und **3.2.2.1.5**) vorgeschaltet, um die erhaltenen Transkripte zur Kontrolle der Primer zu

sequenzieren. Die Primersequenzen basierten auf den cDNA- bzw. mRNA-Sequenzen der NCBI-Datenbank für *hGSTP1* (AY324387), *hGSTA4* (BC063439) und *hNQO1* (NM_000903) (**Anhang Tabelle 9.5**).

Für die Sequenzierung wurden zunächst die *hGSTP1*, *hGSTA4* und *hNQO1* cDNAs mittels Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Southhampton, UK) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt, um überschüssige Nukleotide und Primer zu entfernen. Danach wurde das aufgereinigte cDNA-Template in einer PCR amplifiziert, bei der die für die Sequenzierung benötigten farbstoff-markierten dNTPs eingebaut wurden (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems). Es schloss sich eine erneute Aufreinigung zum Entfernen überschüssiger Nukleotide an (AutoSeq™G-50, Amersham pharmacia biotech), und nach Eindampfen der Probe und anschließendem Aufnehmen in Formamid erfolgte die Sequenzierungsreaktion im HITACHI 3100 Genetic Analyzer.

Die Auswertung des Elektro-Chromatogramms erfolgte mit Hilfe der frei zugänglichen Software Chromas 2 version 2.3 (<http://www.technelysium.com.au>) und die erhaltenen Sequenzen wurde mit den Sequenzen der NCBI Nukleotidsequenz-Datenbank verglichen.

3.2.2.4.4 QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR

Für die Durchführung der real-time RT-PCR wurde zunächst ein Mastermix (**Tabelle 3.8**) angesetzt.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung des Mastermixes (1x Ansatz) für die real-time RT-PCR

TaqMan Universal Mastermix (2 x)	Primer GSTA4, GSTP1, NQO1 (forward/ revers) (1 µM)	ACTB-Mix	TaqMan Sonde (250nM)	dd H ₂ O
10 µl	je 2 µl		2 µl	2 µl
10 µl		1 µl		7 µl

TaqMan® real-time PCR wurde in 96-well MTPs durchgeführt. Es wurden 18 µl Mastermix/Kavität vorgelegt und 2 µl cDNA (8 ng RNA-Äquivalente) zugegeben. Es wurde eine Doppelbestimmung jeden Templates für die 3 voneinander unabhängigen Versuche vorgenommen. Das Temperaturprotokoll der PCR war: 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, 15 sec bei 95°C für 40 (*hGSTP1*, *hNQO1*) - 60 (*hGSTA4*) Zyklen, 1 min bei 60°C.

Den eigentlichen Experimenten wurde ein Validierungsexperiment zur Kontrolle der Primer-Effizienz vorgeschaltet, anhand der die Auswertungsmethode festgelegt wurde. Hierfür wurde cDNA in 1:2-Schritten mit dd H₂O verdünnt und die jeweiligen Gen-Abschnitte für *hGSTP1*, *hGSTA4*, *hNQO1* und *β-Aktin* in einer PCR amplifiziert.

3.2.2.4.5 AUSWERTUNG

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle (C_T)-Wert. Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Amplifikation exponentiell und es gibt keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibierung der PCR-Reaktion durch Generation bestimmter Produkte. Es werden in jedem PCR-Lauf definierte Templatemengen amplifiziert. Daraus lässt sich eine Standardkurve erstellen, anhand derer man von einem bestimmten C_T -Wert auf eine Templatekonzentration schließen kann. Zur relativen Quantifizierung der *hGSTP1*, *hGSTA4* und *hNQO1* mRNA-Expression, normalisiert auf das endogene Referenzgen *β-Aktin*, wurde die „Comparative C_T Method“ ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Kontrolle}} - \Delta C_{T \text{ Behandlung}}$) gemäß den Vorlagen von Applied Biosystems (User Bulletin #2) herangezogen. Der Fold Change wurde nach Ermittlung einer 100%-igen Primer-Effizienz (Validierungsexperiment) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.2.3 BIOCHEMISCHE TECHNIKEN

3.2.3.1 INKUBATION MIT PHYTOESTROGENEN

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden MCF-10A und MCF-7 Zellen nach Vorinkubation in estrogen-depletierten Medium mit den Phytoestrogenen GEN, EQU und ENL in den Konzentrationen von 0-30 μM bzw. dem als Referenzsubstanz dienenden E2 (10 nM) für 48 h inkubiert. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel DMSO (0,1 %).

3.2.3.2 ISOLIERUNG VON GESAMT-PROTEINEN AUS DEN ZELLEN

Für die Zytosolextraktion wurden die geernteten Zellpellets in Homogenisationspuffer mit Proteasehemmer (1 mM Pefabloc) resuspendiert und im Eisbad mittels Ultraschallhomogenisator 1 min mit 40 % der maximalen Leistung (30 W) mechanisch lysiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (16.000 g, 60 min, 4°C) zur Sedimentierung der Zelltrümmer wurden die Überstände (Zytosole) aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.2.3.3 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Die Bestimmung des Proteingehaltes in den Zytosolextrakten erfolgte nach der Methode von Bradford mit BSA als Standardprotein [278]. Der Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G an Sulfhydrylgruppen der Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595 nm verschiebt [279]. Bei dieser Wellenlänge wird die Zunahme der Absorption gegen den freien Farbstoff

photometrisch gemessen. Dabei ist die Menge des entstehenden Farbkomplexes proportional zur vorhandenen Proteinmenge.

Die Quantifizierung der Proteinkonzentrationen erfolgte anhand der Eichreihe mit BSA, welche aus einer 1%-igen Stammlösung für den Konzentrationsbereich 0–150 µg/ml durch Verdünnen mit Homogenisationspuffer hergestellt wurde. Die Zytosole wurden mit Homogenisationspuffer so verdünnt (Verdünnungsfaktor: 150-200), dass ihr Proteingehalt im linearen Bereich der Eichgeraden (10-150 µg BSA/ml) lag. Von den Standards und Zytosolen wurden jeweils 20 µl in 96-well-MTPs aufgetragen. 10 – 30 min nach Zugabe von je 180 µl Bradford-Reagenz wurde die Absorption spektrophotometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration der Zytosole wurde durch lineare Regression der Eichgeraden berechnet.

3.2.3.4 WESTERN BLOT DER GST-ISOENZYME UND NQO1

Die Western Blot-Technik, die auch als Immunoblotting bezeichnet wird, umfasst den Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Trägermembranen mit anschließender Immunodetektion. Dazu werden die Proteingemische mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und über Kapillartransfer oder Elektrotransfer auf einer Membran immobilisiert, um abschließend die entsprechenden Zielproteine (Antigene) mit spezifischen Antikörpern immunologisch nachzuweisen. Mit dieser Methode wurden die als Dimer vorkommenden zytosolischen hGST-Isoenzyme A1/2, A4-4, M1-1, M2-2 und P1-1 sowie die hNQO1-1 semi-quantitativ nachgewiesen. Für die hGSTA4-4 und hNQO1-1 stand kein entsprechendes Standardprotein zur Verfügung, so dass der Nachweis lediglich qualitativ, normalisiert auf β -Aktin erfolgte (Fold Change). Der Nachweis der hGSTM2-2 mittels des GST μ -Antikörpers ist nicht völlig bewiesen, da kein hGSTM2-spezifischer Antikörper und kein entsprechendes Standardprotein für dieses Isoenzym zur Verfügung standen. Die Annahme wurde jedoch durch das sich von hGSTM1-1 unterscheidende geringere Molekulargewicht sowie durch weitere Untersuchungen auf DNA- und mRNA-Ebene gestützt [219]. Die hGSTA1/2, bestehend aus A1-1, A1-2 und A2-2, wurde aufgrund des gleichen Molekulargewichts und gleicher Antikörperspezifität zusammen detektiert.

Das Protokoll der verwendeten Western Blot-Technik nach Ebert *et al.* [231;280] wurde auch in dieser Arbeit für den Nachweis der hGSTs und modifiziert für hNQO1-1 übernommen. Die Besonderheiten in den aufgetragenen Proteinmengen der Zytosolextrakte und der Immunodetektion sind in **Tabelle 3.9** und **Tabelle 3.10** zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Aufgetragene Proteinmengen zum Nachweis der GST-Isoenzyme und NQO1

Zellen	Gesamtprotein (µg) für Detektion von				
	hGSTA1/2	hGSTA4-4	hGSTM1/2	hGSTP1-1	hNQO1-1
MCF-10A	60	80	125	25	60
MCF-7	60	80	125	80	60

Tabelle 3.10: Besonderheiten der Immunodetektion

Schritte	hGSTA1/2, M1/2, P1	hGSTA4-4	hNQO1-1	β-Aktin
Blockieren	5 % Milchpulver in TBST 1 h, RT	5 % Milchpulver in TBST über Nacht, RT	5 % Milchpulver in TBST 1 h, RT	5 % Milchpulver in TBST 1 h, RT
Primärantikörper	mouse anti-hGST (1:5000) über Nacht, RT	chicken anti-hGSTA4 (1:3000); 2,5 h, RT	goat anti-hNQO1 (1:1000) über Nacht, RT	mouse polyclonal antibody (1:10000), 1 h, RT
Waschschritt	TBST 3 x 5 min, RT	TBST 3 x 5 min, RT	TBST 3 x 5 min, RT	TBST 3 x 5 min, RT
Sekundärantikörper	rabbit anti-mouse-HRP (1:800); 1 h, RT	goat anti-chicken-AP (1:10000); 1 h, RT	rabbit anti-goat-AP (1:10000) 1 h, RT	rabbit anti-mouse-HRP (1:10000); 1 h, RT
Waschschritt	TBST; 3 x 5 min, RT	TBST; 3 x 5 min, RT	TBST; 3 x 5 min, RT	TBST; 3 x 5 min, RT
Detektion	DAB, H ₂ O ₂ (kolorimetrisch)	ECL	ECF	ECL

Die Blots der hGSTA1/2, M1/2 und P1-1 (Blende 5,6; Expositionszeit 0,6 sec; Einstellung: colorimetric) und die Chemilumineszenz und Chemifluoreszenz der hGSTA4-4 und hNQO1-1 Blots (Blende 5,6; Expositionszeit 0,6 sec (hGSTA4-4), 5-10 sec (hNQO1-1)) wurden mit dem BioRad-MultimanagerS mit Unterstützung des Programms Quantity OneTM detektiert. Für die Quantifizierung der Banden wurde das „Band Analysis Tool“ der gleichen Software benutzt. Als Auswertungsparameter wurde die „Peak Density“ gewählt. Der Mittelwert der Banden der GST-Proteinstandards für hGSTA1/2, M1/2, P1-1 von jedem Blot diente als Referenz für die Quantifizierung des GST-Proteins der Proben. Die Proteinmenge der nachgewiesenen GST-Isoenzyme wurde jeweils auf die Zellzahl und das Gesamtprotein der Proben bezogen. Die Modulation der Proteinexpression der hGSTA4-4 und hNQO1-1 wurde auf β-Aktin bezogen als Fold Change dargestellt.

3.2.3.5 BESTIMMUNG DER GST-GESAMTAKTIVITÄT

Bei der Methode zur Bestimmung der GST-Gesamtaktivität von Habig *et al.* handelt es sich um einen enzymatischen Aktivitätstest des kontinuierlichen Typs, bei dem die Bildung von S-2,4-dinitrophenylglutathion, des Produkts der GST-katalysierten Konjugation von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) mit Glutathion, quantifiziert wird [281]. Die mit der Produktbildung einhergehende Gelbfärbung der Reaktionslösung führt zu einer Zunahme der

Extinktion bei 340 nm, welche über die Zeit gemessen wird. Mit Ausnahme der hauptsächlich hepatisch vorkommenden GST θ zeigen alle GST-Isoformen gegenüber CDNB eine relativ hohe GSH-konjugierende Aktivität [221].

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 30°C in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,5) mit 1 mM CDNB und 1 mM Glutathion als Substraten. Durch Zugabe des Zytosols wurde die Reaktion gestartet. Die Zunahme der Extinktion bei 340 nm wurde über einen Zeitraum von 5 min gegen den Reaktionsansatz ohne Enzyme spektralphotometrisch gemessen. Der Anstieg im linearen Bereich der Enzymkinetik diente als Grundlage für die Berechnung der Aktivität nach der unten dargestellten Formel. Die resultierende Aktivität des Zytosols wurde auf die Zellzahl und den Proteingehalt bezogen. Letzteres stellt die spezifische Aktivität dar.

$$\text{Aktivität (nmol x min}^{-1} \text{ x ml}^{-1}) = \frac{\Delta E / \text{min} * V * 1000}{\epsilon * d * v}$$

($\Delta E / \text{min}$ = Extinktionsänderung/min; V = Volumen Reaktionsansatz (1 ml); ($9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); d = Schichtdicke (1 cm); v = Volumen Zytosol (25-100 μl))

3.2.3.6 BESTIMMUNG DES INTRAZELLULÄREN GLUTATHION-STATUS

Reduziertes (GSH) und oxidiertes Glutathion (GSSG) stellen zusammen ein zelluläres Puffersystem zur Regulation oxidativer Vorgänge dar. Die Methode beruht auf der Absorption einer chromophoren Thion-Verbindung bei 400 nm, welche in einer Zwei-Schritt-Reaktion gebildet wird.

Nach Ernte der Zellen wurden diese in 5 %-iger Metaphosphorsäure resuspendiert, um das die Messung störende Protein aus der Lösung zu entfernen, mittels Ultraschall 2 min homogenisiert und anschließend zur Entfernung der Zelltrümmer abzentrifugiert (9.500 g, 10 min, RT). Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Messung bei - 20°C aufbewahrt.

Die Quantifizierung der GSH-Konzentrationen erfolgte anhand einer Eichreihe, welche aus einer 0,5 mM GSH-Stammlösung für den Konzentrationsbereich 0–100 μM durch Verdünnen mit Metaphosphorsäure hergestellt wurde. Von den Standards und Zytosolen wurden jeweils 60 μl in einer 96-well-MTP doppelt aufgetragen. 10 min nach Zugabe von je 140 μl Reagenz des GSH-Kits (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach, Germany), angesetzt nach den Angaben des Herstellers, wurde die Absorption bei 400 nm im MTP-Photometer gemessen. Die GSH-Konzentration der Zytosole wurde durch lineare Regression der Eichgeraden berechnet und auf die Zellzahl bezogen.

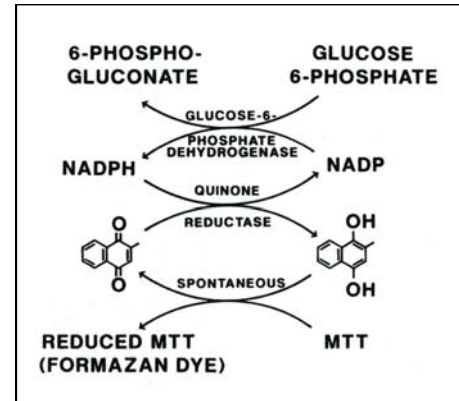
$$\text{GSH (nmol/10}^6 \text{ Zellen)} = \frac{\text{OD}_{400} \times \text{Volumen}_{\text{gesamt}}}{\text{Volumen}_{\text{eingesetzt}} \times \epsilon \times 10^6 \times \text{Zellzahl}}$$

(OD = Optische Dichte (Absorption), ϵ = Extinktionskoeffizient)

3.2.3.7 BESTIMMUNG DER NQO-AKTIVITÄT

Der NQO-Aktivitätsassay, durchgeführt in 96-well-MTPs, beruht auf der direkten Bestimmung der Quinonoxidoreduktase (hNQO1) im Zytosol durch Messung der NADPH-abhängigen Menadiol-vermittelten Reduktion von MTT (**Abbildung 3.4**) [282].

Abbildung 3.4: Prinzip der NQO Aktivitätsbestimmung



Nach Inkubation der MCF-10A und MCF-7 Zellen in 96-well-MTPs wurden die Zellen mit einer Lyselösung (50 µl/Kavität), bestehend aus 2 mM EDTA (pH 7,8) und 0,8 % Digitonin, für 30 min bei 37°C behandelt, mit dem Ziel, Zell- und Kernmembranen zu permeabilisieren. Anschließend wurde die Reaktionslösung (0,5 M Tris-HCl (pH 7,4), 7,5 % BSA (w/v), 1,5 % Tween-20, 7,5 mM FAD, 150 mM Glc 6-P, 50 mM NADP, 30 U yeast Glc 6-P Dehydrogenase, 4,5 mg MTT, dd H₂O, 50 mM Menadion) (100 µl/Kavität) zupipettiert. Nach 30 min (MCF-10A) bzw. 20 min (MCF-7) war die Formazan-Bildung abgeschlossen und die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM Kaliumphosphat (pH 7,4) und 0,3 mM Dicumarol gestoppt. Die Messung der Absorption des gebildeten Formazan-Farbstoffes erfolgte mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenzwellenlänge 650 nm). Die Modulation der NQO-Aktivität nach Substanzinkubation wurde durch Bezug der gemessenen Absorptionen auf die der Kontrolle DMSO (100 %) berechnet.

3.2.4 GENOTOXIZITÄTSTESTS

Die Untersuchungen zum karzinogenen Potential Brustkrebs-relevanter Risikofaktoren und zum Einfluss des Phase II-Enzym-Status der MCF-10A und MCF-7 Zellen auf die Genotoxizität spezifischer Risikofaktoren wurden mit der Einzelzellmikrogelelektrophorese („Comet Assay“) unter alkalischen Bedingungen nach Singh *et al.* [283] und modifiziert nach Pool-Zobel *et al.* [284] durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, sowohl Einzel- und Doppelstrangbrüche als auch alkalilabile Stellen, Cross Links und Exzisionsreparatur-Stellen in der DNA einzelner Zellen nachzuweisen. Das Prinzip beruht auf der Migration der im elektrischen Feld schneller wandernden geschädigten DNA aus der Kern-DNA, welche nach Anfärbung als Kometenschweif sichtbar wird.

3.2.4.1 PRINZIP DER EINZELZELMIKROGELELEKTROPHORESE

Nach Beendigung der Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Zellen abzentrifugiert (300 g, 5 min, RT), in PBS bzw. phenolrotfreien RPMI gewaschen und deren Vitalität bestimmt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 0,7 %-iger Low-Melting-Agarose (LMA) aufgenommen, auf mit Normal-Melting-Agarose vorbeschichteten Objektträgern (OT) je Probe dreifach aufgetragen und durch eine abschließende LMA-Schicht vollständig in Agarose eingebettet. Anschließend wurden die OTs für mindestens 1 h in einer alkalischen Lyselösung (pH > 13) bei 4°C aufbewahrt. Für das „alkaline unwinding“ der DNA und die Umwandlung alkalilabiler Stellen in Einzelstrangbrüche wurden die OTs nach der Lyse 20 min im Elektrophoresepuffer (pH 13) inkubiert und anschließend zur Migration der DNA einer Elektrophorese bei 25 V und 300 mA für 20 min unterzogen. Nach anschließender Neutralisation wurden die OTs mit SYBR[®] Green angefärbt und bis zu ihrer Vermessung bei 4°C feucht gelagert.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der DNA-Schäden erfolgte mit Unterstützung des Bildauswertesystems Komet 4.0 (Kinetic Imaging, UK), wobei für jede Konzentration die DNA von 150 Zellen (50 Zellen/OT als Dreifachbestimmung) vermessen und die Messwerte gemittelt wurden. Als Auswertungsparameter diente die „Tail Intensity“ (TI), welche den prozentualen Anteil der Fluoreszenz im Kometenschweif darstellt.

3.2.4.2 DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNGEN

Die Zellen wurden mit den in PBS bzw. DMSO gelösten potenziell genotoxischen Testsubstanzen vor Licht geschützt inkubiert (**Tabelle 3.11**). Für jede Testkonzentration, das Inkubationsmedium und die höchste DMSO-Konzentration (0,1 %) wurde jeweils 1 Aliquot mit $0,5 \times 10^6$ Zellen angesetzt.

Tabelle 3.11: Inkubationsbedingungen der Testsubstanzen im Comet-Assay

Substanz	Stammlösung (mM)	Testkonzentration (µM)	Inkubations-Medium	Inkubationsbedingungen
E2	100	0,001-1000	RPMI	1 h, 2 h, 4 h, 24 h, 37°C
4-OH-E2	100	0,01-1	RPMI	2 h, 37°C
H ₂ O ₂	9790	4,5-150	PBS	5 min, 4°C
HNE	7	25-150	RPMI	30 min, 37°C
BaP	100	10-200	RPMI	30 min, 37°C
BPDE	100	1-100	RPMI	30 min, 37°C
Menadion	20	0,25-10	RPMI	30 min, 37°C

Im Anschluß an die Inkubation wurde mit dem Comet Assay wie unter **3.2.4.1** beschrieben fortgefahren und die induzierten DNA-Schäden ermittelt.

3.2.4.3 REPARATURVERSUCHE

Die Untersuchungen zur Reparaturkapazität der transformierten MCF-7 Zellen wurden unter Verwendung von H_2O_2 durchgeführt.

Die Inkubation der Zellen (2×10^6 Zellen/ml) mit H_2O_2 (18,75 μM) und der Kontrolle PBS erfolgte wie im **Abschnitt 3.2.4.2** beschrieben. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und auf jeweils 7 Eppendorf-Tubes aliquotiert ($0,5 \times 10^6$ Zellen). Zwei Tubes (je ein Tube für PBS und H_2O_2) wurden zum Zeitpunkt 0 min abzentrifugiert (300 g, 5 min, RT) und auf OTs aufgetragen, die übrigen nach einer Inkubationszeit von 10, 15, 20, 30, 60 und 120 min bei 37°C. Im Folgenden wurde mit den OTs wie unter **3.2.4.1** verfahren.

3.2.4.4 CHALLENGE-ASSAY

Für die Untersuchungen zur Chemoprotektion durch Phytoestrogene wurden MCF-10A und MCF-7 Zellen mit GEN (1-30 μM), Inkubationsmedium und der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %) 48 h vorinkubiert. Nach der Zellernte wurden je Behandlung $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen in ein Tube überführt und mit dem schädigenden Agens (HNE, Menadion, BPDE) bei 37°C unter leichtem Schütteln und vor Licht geschützt inkubiert (**Tabelle 3.12**). Im Anschluß erfolgte die Lyse, Elektrophorese und Färbung (**Kapitel 3.2.4.1**).

Tabelle 3.12: Inkubationsbedingungen der Testsubstanzen im Challenge-Assay

Substanz	Stammlösung	Testkonzentrationen		Inkubationszeit
		MCF-10A	MCF-7	
HNE	7 mM	150 μM	75 μM	30 min
Menadion	20 mM	10 μM	5 μM	30 min
BPDE	100 mM	50 μM	20 μM	30 min

3.2.5 ANALYTIK: BESTIMMUNG DER ZELLULÄREN AUFNAHME VON GENISTEIN

Die Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Phytoestrogenen am Beispiel von GEN wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. S. Kulling an der BFEL durchgeführt, die die Analysen durchführte.

MCF-10A und MCF-7 Zellen wurden in einer Dreifach-Bestimmung in 6-well-MTPs ($0,6$ bzw. $0,8 \times 10^6$ Zellen/Kavität) ausgesät. 24 h nach Umsetzen der Zellen auf estrogen-depletiertes Medium wurden sie mit 1 μM und 10 μM GEN bzw. 0,1 % DMSO für 1 h und 24 h behandelt. Die restliche Inkubationslösung wurde bis zur Analyse und Kontrolle der Inkubationskonzentrationen bei -20°C gelagert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Mediumüberstand abgenommen und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS+BSA gespült, um unspezifisch adsorbierte, an der Oberfläche der Zelle sitzende Isoflavone zu entfernen. Die Spüllösung wurde zu den Mediumüberständen

gegeben. Durch Zugabe von dd H₂O wurden die Zellen lysiert, mit einem Zellschaber von der Platten-Oberfläche gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen zusätzlich einer mechanischen Behandlung mittels Ultraschall (auf Eis) ausgesetzt [102]. 50 µl des erhaltenen Zelllysats wurden für die Proteinbestimmung nach Bradford (**Kapitel 3.2.3.3**) abgenommen, der Rest abzentrifugiert (10.000 g, 30 min, 4°C). Danach wurde die zytosolische Fraktion (Überstand) abgenommen und in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß pipettiert, das Zellpellet erneut mit dd H₂O (100 µl) gewaschen, zentrifugiert und vom Überstand getrennt. Die somit erhaltenen Zytosol- und Membranfraktionen wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Aliquote der Überstände, Membranfraktionen und Zytosole wurden mittels HPLC und UV-Detektion bei 260 nm analysiert, unter Verwendung einer ProntoSIL (150 nm x 4.0 mm i. d., Partikelgröße 3 µm) reversed-phase Säule (Bischoff, Leonberg, Germany). Die Elution wurde durch einen linearen Gradienten erzielt. Die aufgetretenen Peaks zwischen 190 nm und 400 nm wurden aufgezeichnet.

Die Konzentrationen von GEN und der Metabolite im Inkubationsmedium und den Mediumüberständen wurde in µM angegeben, die im Zytosol und den Membranen in µM und pmol (Stoffmenge). Über die Stoffmenge wurde zum einen die Menge an GEN (pmol)/mg Protein und zum anderen die Menge an GEN/Zellvolumen (µmol/l) berechnet. Der für die Berechnung des Zellvolumens benötigte Zelldurchmesser wurde mit Hilfe eines Beckman Coulter Counters (UK) ermittelt.

3.2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Ergebnisse der Inkubationsversuche wurden gemittelt und sind als Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± SD) von mindestens 3 unabhängigen Versuchen angegeben. Darüber hinaus wurden für die Bestimmungen der Proliferationsrate und der metabolischen Aktivität und für die Untersuchungen mittels Comet Assay in jedem Versuch 3 parallele Ansätze durchgeführt, deren Mittelwert die Grundlage für die einzelnen Versuche bildete. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Proliferationsverhalten, der metabolischen Aktivität und zur Modulation der Genotoxizität wurden prozentual auf die unbehandelte Lösungsmittelkontrolle DMSO (100 % Wert) bezogen. Bei Messreihen, in denen sich die einzelnen Messpunkte in einem Parameter änderten (Zeit, Konzentration), erfolgte die statistische Überprüfung der Ergebnisse mittels One-way ANOVA und Dunnett's Posttest (Vergleich der Messwerte der Behandlung mit denen der Kontrolle). Der statistische Vergleich der Zelllinien bzw. die Wirkung zweier Substanzen erfolgte mittels Two-way

ANOVA und Bonferroni Posttest. Die statistische Auswertung der Genexpressionsanalysen wurde nach vorausgegangener Varianzanalyse (F-Test) mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten t-Tests durchgeführt. Zur statistischen Berechnung wurden die Programme EXCEL und GraphPad Prism Version 4.01 für Windows genutzt. Die verwendeten Analysemethoden sind im Ergebnis der jeweiligen Untersuchung angegeben. Als statistisch signifikant wurden Analysen mit $p < 0,05$ bewertet. In den Grafiken wurden $p < 0,05$ mit *, $p < 0,01$ mit ** und $p < 0,001$ mit *** kenntlich gemacht. Die Beziehung zwischen hGSTP1-1 Proteinlevel und GST-Aktivität wurde unter Verwendung der linearen Regression überprüft. Die Ermittlung der EC_{50} -Konzentrationen erfolgte über die Nichtlineare Regression.

Abbildung 3.5 zeigt eine Zusammenfassung aller in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsebenen unter Angabe der verwendeten Methoden.

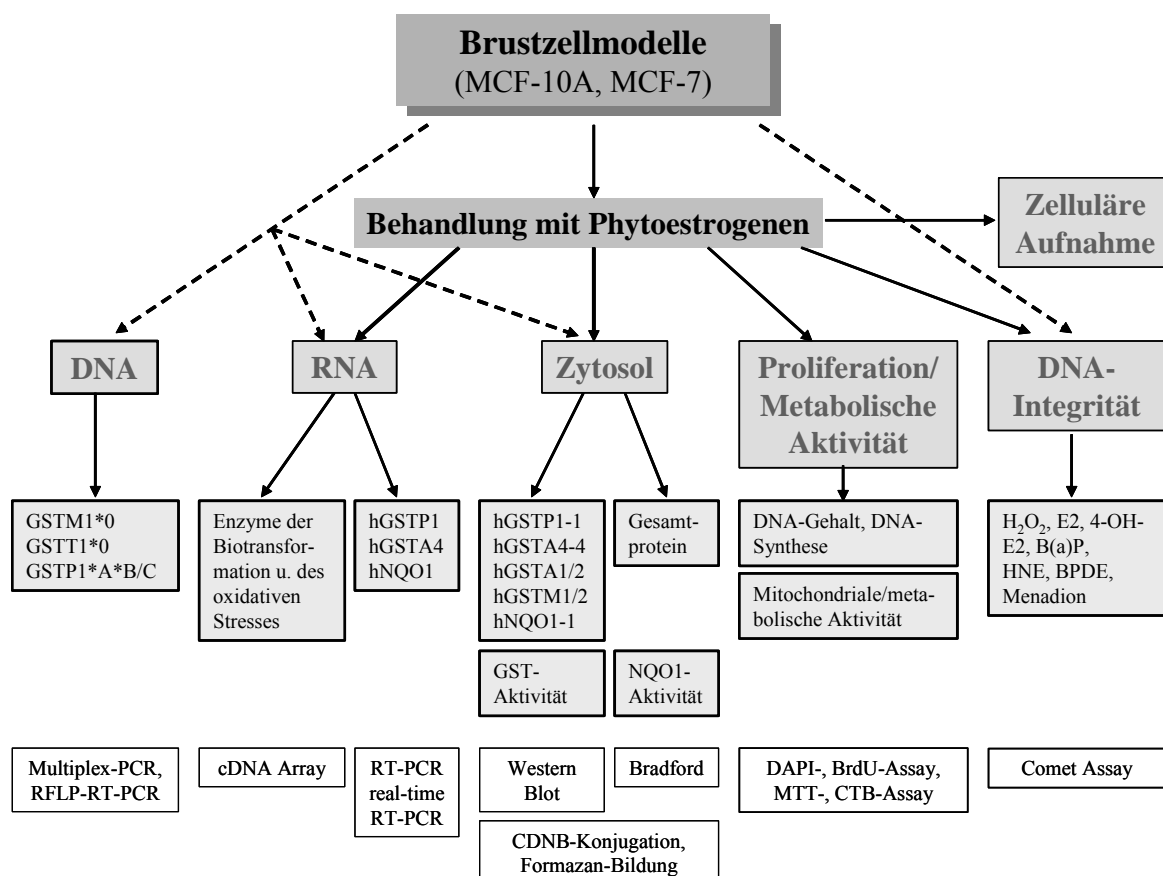


Abbildung 3.5 Übersicht der in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen unter Angabe der verwendeten Methoden

4 ERGEBNISSE

4.1 BEWERTUNG DER SENSITIVITÄT HUMANER MAMMAZELLEN GEGENÜBER FÜR DIE MAMMAKARZINOGENESE BEDEUTENDEN PROTEKTIVEN FAKTOREN UND AUSGEWÄHLTEN RISIKOFAKTOREN

4.1.1 CHARAKTERISIERUNG DER HUMANEN MAMMAZELLINIEN

Für die Untersuchungen zur chemoprotektiven Wirkung von Phytoestrogenen an humanen Brustzellen wurden die Zelllinien MCF-10A und MCF-7 als *in vitro*-Modelle gewählt. Diese repräsentieren unterschiedliche Stadien des Mammakarzinogeneseprozesses, nämlich nicht-transformierte und transformierte humane Brustgewebszellen. Im Vorfeld der Untersuchungen galt es zunächst, basale Parameter wie Zelltyp, Karyotyp, Anheftungsrate und Wachstumsverhalten zu ermitteln, um diese, in unserem Labor noch nicht etablierten Zelllinien genauer zu charakterisieren und so die Basis für nachfolgende Untersuchungen zu schaffen.

4.1.1.1 NACHWEIS DES EPITHELIALEN URSPRUNGS

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz (**Kapitel 3.2.1.3**) wurde zur Überprüfung des epithelialen Ursprungs der Zelllinien sowie zum Ausschluss einer Fibroblasten-Kontamination der Kultur angewandt. Positivkontrolle für den Fibroblasten-Antikörper waren aus humanem Biopsiematerial isolierte Kolonfibroblasten. **Abbildung 4.1** zeigt die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung.

Die Mammazelllinien reagierten positiv auf den epithelzellspezifischen Antikörper Ber-EP4, während die Kolonfibroblasten keine Fluoreszenz zeigten. Im Gegensatz dazu wurden mit dem Anti-Fibroblasten-Antikörper FIB1-AS02 lediglich die Kolonfibroblasten angefärbt, MCF-10A und MCF-7 Zellen wiesen dagegen keine Markierung auf. Die PBS-Kontrolle (ohne Primärantikörper) war bei allen getesteten Zellen und Antikörpern negativ, so dass falschpositive Fluoreszenzsignale aufgrund unspezifischer Hintergrundbindung der Antikörper ausgeschlossen werden können. Die Ergebnisse weisen somit eindeutig den epithelialen Charakter der Zelllinien MCF-10A und MCF-7 nach und zeigen auch, dass die Zelllinien fibroblastenfreie Zellpopulationen sind (**Abbildung 4.1**).

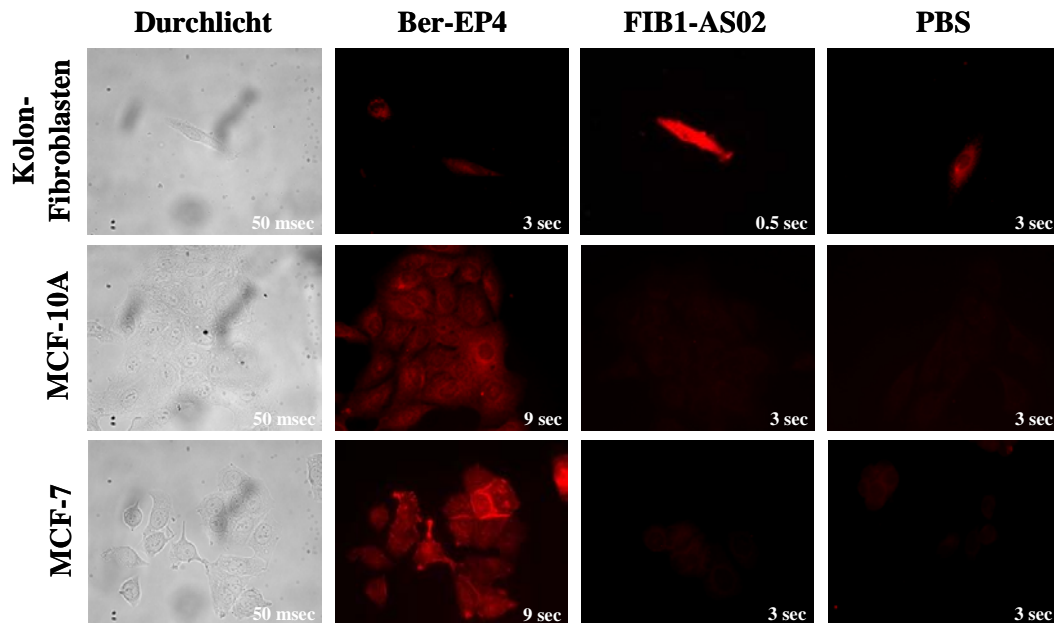


Abbildung 4.1: Indirekte Immunfluoreszenz von Ep-CAM- bzw. Thy-1 (CD90)-Antigen in MCF-10A, MCF-7 und primären Kolonfibroblasten.

Nach Aussaat der Zellen auf Deckgläschen wurden diese im jeweiligen Kulturmedium in 6-well-Platten kultiviert und im Anschluss der Immunfärbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der für jede Zellart optimalen Belichtungszeit (msec bzw. sec). Die Morphologie der einzelnen Zelltypen ist in den Durchlichtaufnahmen gezeigt.

4.1.1.2 KARYOTYPISIERUNG DER MAMMAZELLEN

Während bei Zellen des gesunden Brustgewebes ein diploider Karyotyp vorliegt, war der Karyotyp der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien nicht bekannt. Zwar wurde jede Zelllinie bei der Etablierung hinsichtlich ihres Karyotypes untersucht [258;259], allerdings ist bekannt, dass sich Kulturzellen mit der Zeit der Kultivierung und in Abhängigkeit vom Laboratorium verändern.

Die von der Arbeitsgruppe von Prof. U. Claussen (Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena) durchgeführte Karyotypisierung (**Kapitel 3.2.1.4**) der MCF-10A Zellen mittels 24-Farben-FISH zeigte einen diploiden Karyotyp mit geringer Anzahl an Aberrationen (**Anhang Abbildung 9.1**), worunter Deletionen, Isochromosomen und derivative Chromosomen zu finden sind ($<2n>47;XX;del(1q);+i(1q);der(3)t(3;5);i(8q);der(9)t(9;3;5)$).

Die Auswertung der Metaphasen der MCF-7 Zellen war sehr schwierig, da jede Metaphase ein anderes Aberrationsspektrum aufwies. 4 von 10 Metaphasen wurden schließlich analysiert und karyotypisiert. Die Zellen zeigten einen hypertetraploiden Karyotyp mit 72-75 Chromosomen und zahlreichen Aberrationen (**Anhang Abbildung 9.2**). Beim Vergleich des Karyotypen mit dem vom DSMZ (www.dsmz.de), der als hypotetraploid (80-87 Chromosomen) beschrieben wurde, stimmten folgende Aberrationen überein: $-X;-X;-1;-1;-9;-10;-10;-$

13;-13;-17;-18;-20;-20;-20;-22;-22;-22;der(2)t(2;3)x2; der(5)t(5;?);der(1). Diese Aberrationen waren in mindestens 2 der Karyogramme beobachtet worden.

4.1.1.3 WACHSTUMSKINETIK UND ERMITTLUNG DER GENERATIONSZEIT

Für die Zellkultur- und Inkubationsexperimente war es erforderlich, das Wachstumsverhalten der Mammazellen in Kultur zu charakterisieren. Dazu wurde eine Wachstumskinetik unter Standardkulturbedingungen erstellt (**Kapitel 3.2.1.5**).

In **Abbildung 4.2** sind die Wachstumskinetiken der Zelllinien dargestellt. Bei beiden Zelllinien betrug die lag-Phase, d.h. die Phase der Adhäsion, 24 h. Danach begann das exponentielle Zellwachstum (log-Phase), welches nach ca. 144 h in die Plateauphase mündete. Die Vitalität nach Ernte der Zellen blieb über den gesamten Versuchszeitraum mit durchschnittlich $99 \pm 0,9 \%$ (MCF-10A) und $93 \pm 0,4 \%$ (MCF-7) unbeeinflusst. Die Anheftungsraten 24 h nach Zellaussaat lagen bei beiden Zelllinien bei ca. 99 %. Die aus dem linearen Kurvenverlauf (log-Phase) ermittelten Generationszeiten betrugen für die dysplastischen MCF-10A Zellen 23 h und für die transformierten MCF-7 Zellen 30 h.

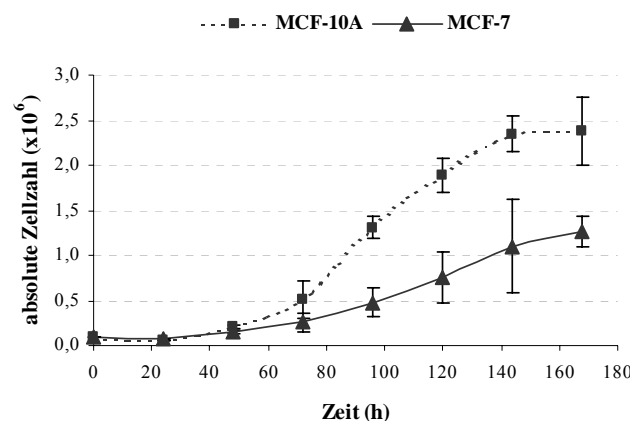


Abbildung 4.2: Wachstumskinetik der MCF-10A und MCF-7 Mammazelllinie

Die Bestimmung der absoluten Zellzahl zu definierten Zeitpunkten, angegeben in $MW \pm SD$ ($n = 3$), erfolgte mittels Trypanblau-Ausschlußtest.

Zusammenfassung 4.1.1: Die Untersuchungen zur Zellcharakterisierung zeigten, dass die hier verwendeten Zelllinien, die unterschiedliche Stadien im Karzinogeneseprozess repräsentieren, epithelialen Ursprungs waren. Bezüglich des Karyotyps bestanden große Unterschiede. Während die dysplastischen MCF-10A Zellen einen nahezu diploiden und stabilen Karyotyp aufwiesen, waren die MCF-7 Tumorzellen hochabberrant und sehr instabil in ihrem Karyotyp. Die Verdopplungszeiten der Zellen waren dagegen vergleichbar.

4.1.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR PHYTOESTROGEN-WIRKUNG IN MAMMAZELLEN UNTERSCHIEDLICHEN TRANSFORMATIONSGRADES

Zahlreiche in der Literatur beschriebene *in vitro*- und *in vivo*-Experimente zeigten, dass Isoflavone und Lignane das Wachstum von Krebszellen unterdrücken und somit als „suppressing agents“ chemoprotektiv gegen die Entwicklung von Brustkrebs wirken. Die Mehrheit dieser Studien betrachteten jedoch vorrangig die Hauptisoflavone GEN und DAI und das Lignan ENL in etablierten Brustkrebsmodellen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die potenziell chemoprotektiven Effekte der Isoflavone GEN, DAI und ihrer bakteriellen Darmmetabolite, eines Isoflavon-Gemisches (Mix(EQU)) und der Säugerylignane ENL und END in den dysplastischen MCF-10A Zellen zu ermitteln und diese biologischen Effekte mit denen in den tumorigenen MCF-7 Zellen zu vergleichen. Die Gemisch-Zusammensetzung von 64 % GEN, 29 % DAI und 7 % EQU wurde anhand humaner Plasmalevel ermittelt [72;73;285;286]. Als Referenzsubstanzen zur Bewertung der estrogenen und antiestrogenen Eigenschaften der Phytoestrogene dienten die Estrogene E2, 2-OH-E2 und 4-OH-E2. Der gewählte breite Konzentrationsbereich reichte von physiologischen Dosen (0,1 µM), die nach Sojakonsum im Plasma detektierbar sind, bis hin zu unphysiologischen Dosen (80 µM). Untersuchte Endpunkte waren einerseits die Bestimmung des DNA-Gehaltes (DAPI-Assay) und die DNA-Syntheserate (BrdU) und andererseits die Ermittlung der metabolischen Aktivität (MTT-Assay, CellTiter®-Blue). Auf Basis dieser Untersuchungen sollten effektiv wirksame Metabolite, geeignete Konzentrationen sowie optimale Inkubationszeiten für die nachfolgenden Untersuchungen ermittelt werden.

4.1.2.1 MODULATION DES DNA-GEHALTES ALS MAß FÜR DIE ZELLZAHL

Die **Abbildungen 4.3-4.7** zeigen die Entwicklung des DNA-Gehaltes als Maß für die Zellzahl in den beiden untersuchten Zelllinien nach 48-stündiger Behandlung mit den Testsubstanzen, denen mindestens drei unabhängig voneinander replizierte Versuche zugrundeliegen. Eine Übersicht der individuellen Wachstums-Response der Zellen auf die Testsubstanzen unter estrogen-depletierten Bedingungen über den gesamten Inkubationszeitraum (24 h, 48 h, 72 h) gibt **Tabelle 9.6 im Anhang**.

GEN, DAI und deren bakterielle Metabolite, mit Ausnahme des DHDAI, hemmten das Wachstum der MCF-10A Zellen (**Abbildung 4.3-4.4**). Diese Effekte waren dosis- und zeitabhängig und erreichten bei Konzentrationen von > 10 µM statistische Signifikanz (**Anhang Tabelle 9.6**). Dabei bestanden Unterschiede in der Wirkungsstärke der Verbindungen. Mitglieder der GEN-Familie schienen effektiver als DAI-Abkömmlinge zu sein, wie anhand der ermittelten EC₅₀-Werte deutlich wird (**Anhang Tabelle 9.7**) Eine 48-stündige Inkubation

fürte zu halbmaximalen Hemmkonzentrationen von 35 μM und 73 μM für GEN und DHGEN, während aus der DAI-Familie ausschließlich EQU diese erreichte ($\text{EC}_{50} = 45 \mu\text{M}$).

Im Gegensatz zur Wachstumshemmung in MCF-10A zeigten die Isoflavone proliferative Effekte in MCF-7 Zellen (Abbildung 4.3-4.4, Anhang Tabelle 9.6), welche ebenfalls zeitabhängig waren. GEN erwies sich als der stärkste Induktor des MCF-7 Zellwachstums und erhöhte den DNA-Gehalt bereits nach 48 h bei physiologischen Konzentrationen von 0,1 μM um max. $32 \pm 3,8 \%$ und bei 1 μM um max. $36 \pm 5,5 \%$. Die 72-stündige Behandlung führte zu einer weiteren Wachstumsinduktion (0,1 μM : $+51 \pm 6,2 \%$ und 10 μM : max. $+63 \pm 7,8 \%$). Die anderen Isoflavone waren schwächer wachstumsinduzierend ($\geq 1\text{-}20 \mu\text{M}$: $\emptyset +31 \%$ nach 48 h und $\geq 0,1\text{-}20 \mu\text{M}$: $\emptyset +35 \%$ nach 72 h). GEN und EQU zeigten nach 48 h Inkubation zudem antiproliferative Effekte bei der höchsten Konzentration von 80 μM , wobei die EC_{50} nicht erreicht wurde (Anhang Tabelle 9.7).

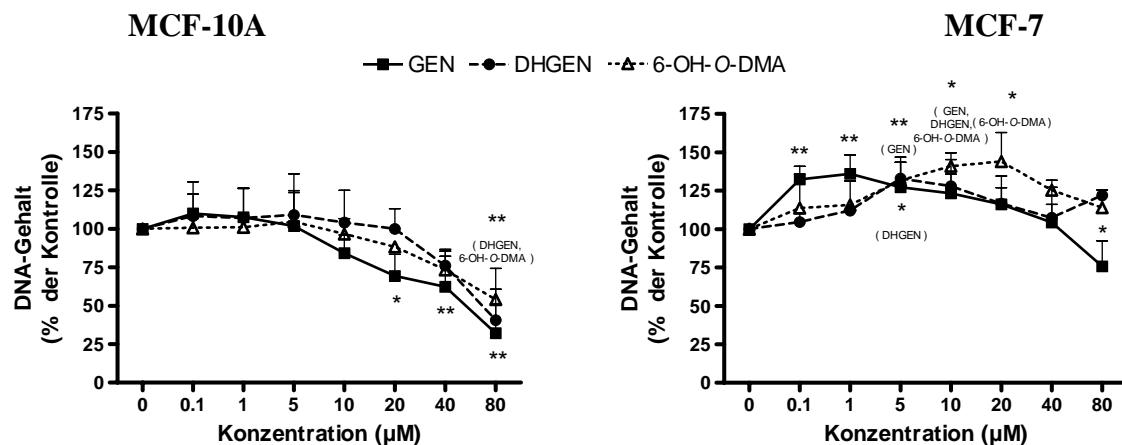


Abbildung 4.3: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit GEN und dessen bakteriellen Metaboliten nach 48 h

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW \pm SD, $n \geq 3$ (MCF-10A), $n \geq 3$ (MCF-7), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

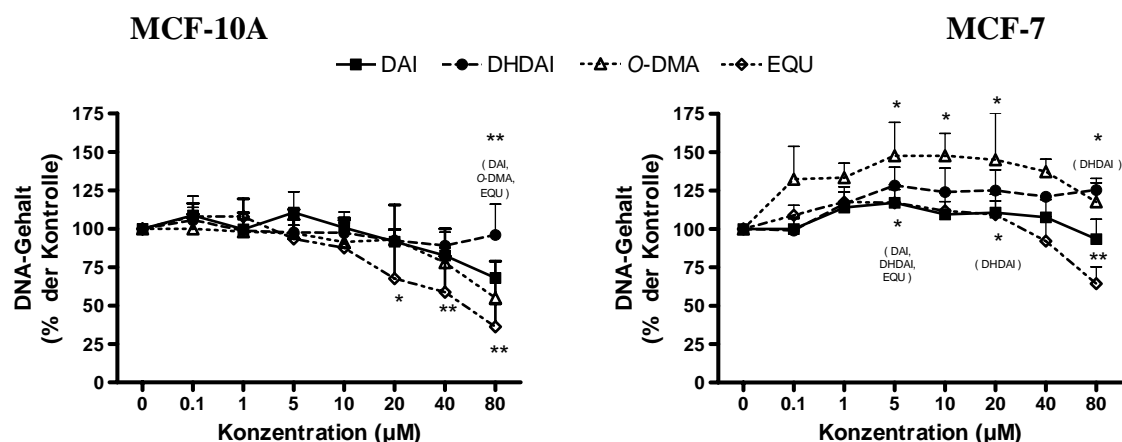


Abbildung 4.4: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit DAI und dessen bakteriellen Metaboliten nach 48 h

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW \pm SD, $n \geq 3$ (MCF-10A), $n \geq 3$ (MCF-7), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Neben dem racemischen Gemisch EQU wurde auch der Einfluss des biologisch aktiven Metaboliten S-EQU auf die Proliferation der Mammazellen untersucht. S-EQU modulierte das Wachstum der MCF-10A Zellen zu keiner Expositionszeit und war damit schwächer wirksam als EQU. In den MCF-7 Zellen war nach 24 h und 48 h Inkubation kein Einfluss der beiden Isomere auf das Wachstum zu beobachten. Aber nach 72 h induzierte S-EQU das Zellwachstum deutlich stärker als das racemische Gemisch (max. $+61 \pm 10 \%$ bei $1 \mu\text{M}$ für S-EQU und max. $+30 \pm 19 \%$ bei $5 \mu\text{M}$ für EQU) (**Anhang Abbildung 9.3, Anhang Tabelle 9.6**).

Die wachstumsmodulierenden Effekte des synthetischen Isoflavon-Gemisches Mix(EQU) im Vergleich zu denen der isolierten Isoflavone (GEN, DAI, EQU) in den Brustzellen sind in **Abbildung 4.5** dargestellt. Der Mix(EQU) hemmte das MCF-10A-Zellwachstum bei Konzentrationen von $10\text{--}40 \mu\text{M}$ nach 24 h, 48 h und 72 h signifikant (EC_{50} : $50 \mu\text{M}$, $42 \mu\text{M}$ und $33 \mu\text{M}$) (**Anhang Tabelle 9.7**). Die Wachstumshemmung von ca. $45 \pm 16 \%$ bei $40 \mu\text{M}$ nach 48 h beruht auf additiven Effekten der drei Isoflavone GEN, DAI und EQU in Kombination. Im Gegensatz dazu wurde in MCF-7 Zellen eine starke Wachstumsinduktion durch Mix(EQU) bereits ab physiologischen Dosen ($0,1 \mu\text{M}$: $+39 \pm 13 \%$; $1 \mu\text{M}$: $+56 \pm 11 \%$) beobachtet. Das synthetische Gemisch zeigte stärkere Effektivität als die isolierten Verbindungen, was auf einen synergistisch proproliferativen Effekt von GEN, DAI und EQU in Kombination hinweist.

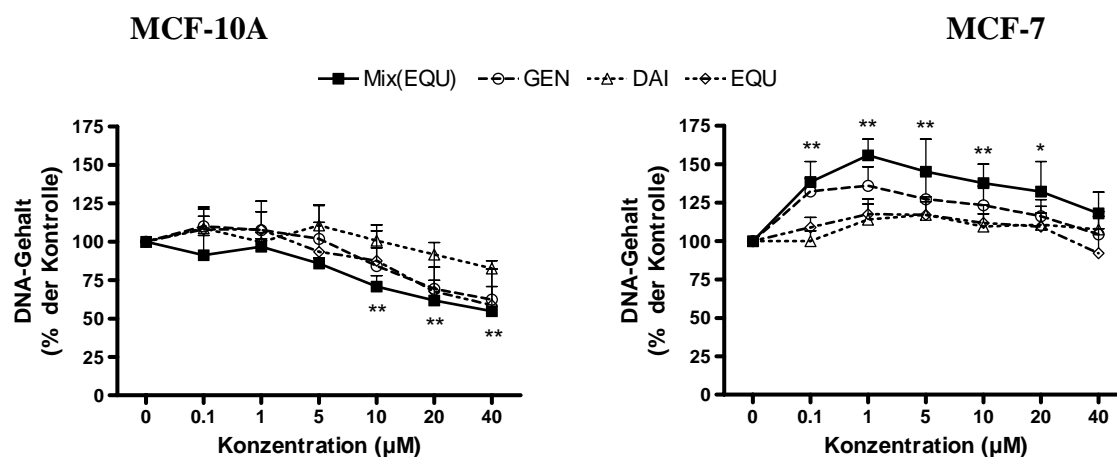


Abbildung 4.5: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit Mix(EQU) im Vergleich zu den isolierten Isoflavonen nach 48 h

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW \pm SD, n = 5 (MCF-10A), n = 3 (MCF-7), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Den Einfluss der Säugerlignane ENL und END auf den DNA-Gehalt der untersuchten Zelllinien nach 48 h zeigen **Abbildung 4.6** und **Tabelle 9.6 im Anhang**. Die Lignane zeigten erst bei Konzentrationen von $\geq 80 \mu\text{M}$ signifikante wachstumsmodulierende Wirkungen. ENL hemmte das MCF-10A-Wachstum nach 24 h und 72 h und das MCF-7-Wachstum nach 48 h und 72 h signifikant. ENL zeigte zudem eine Wachstumsinduktion in MCF-7 Zellen bei $10 \mu\text{M}$

nach 48 h und bei 5-40 μM nach 72 h (Anhang Tabelle 9.6). END wirkte ausschließlich in MCF-10A Zellen wachstumsinhibierend (24 h und 72 h) (Anhang Tabelle 9.6).

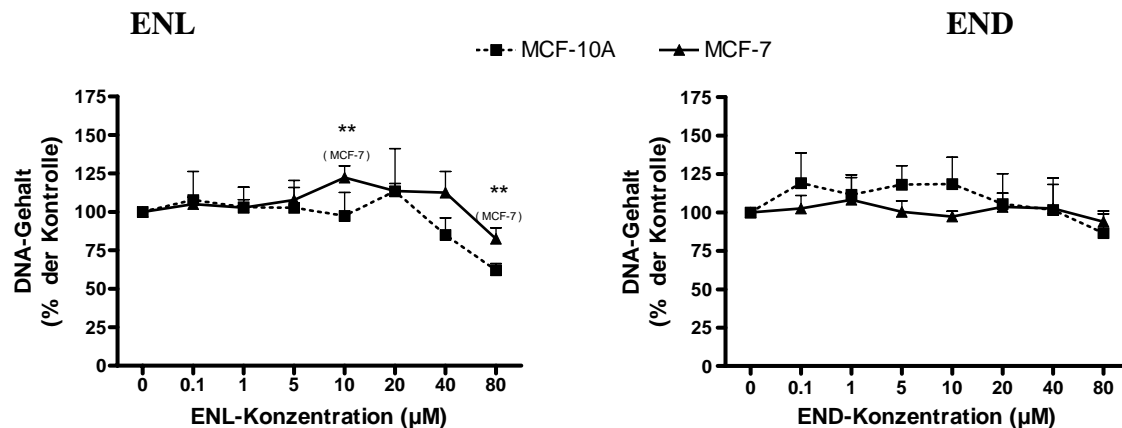


Abbildung 4.6: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit ENL und END nach 48 h

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW \pm SD, n = 3 (MCF-10A), n = 4 (MCF-7), *p<0,05, **p<0,01, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Die antiproliferativen Effekte von GEN (>40 μM), DAI (80 μM), ENL (>10 μM) und END (80 μM) waren in MCF-7 Zellen signifikant stärker ausgeprägt, wenn estrogenhaltiges Medium (10 %FCS) verwendet wurde (Anhang Abbildung 9.4, Anhang Tabelle 9.7).

Die Wachstumsmodulation durch Estrogene in den Zelllinien zeigt **Abbildung 4.7**. Die estrogenen Verbindungen hemmten das Wachstum beider Zelllinien nach 48 h ab einer Konzentration von 5 μM signifikant. Dabei ist die Rangfolge der Wirkungskraft 2-OH-E2 > 4-OH-E2 = E2. Einzig E2 zeigte in MCF-7 Zellen signifikant wachstumsstimulierende Effekte nach 24 h und 72 h (1 μM) (Anhang Tabelle 9.6).

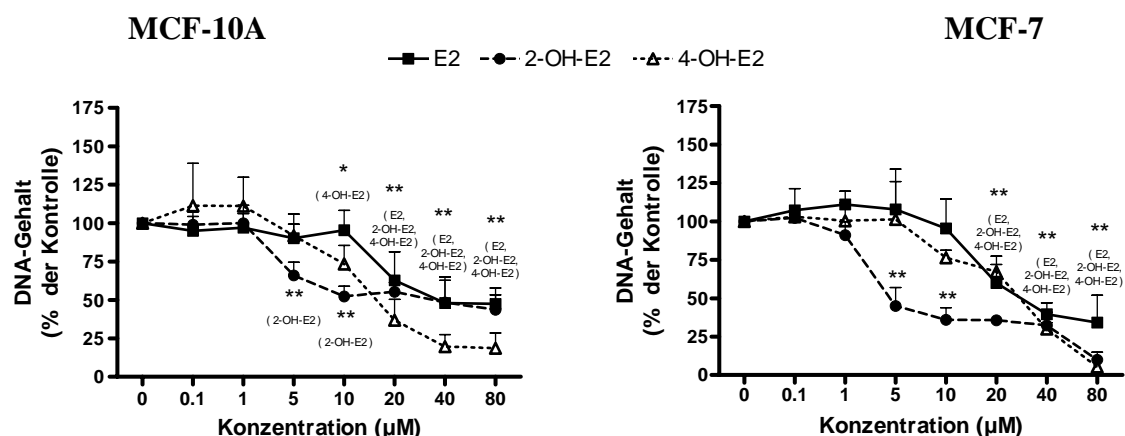


Abbildung 4.7: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit Estrogenen nach 48 h

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW \pm SD, n \geq 3 (MCF-10A), n \geq 3 (MCF-7), *p<0,05, **p<0,01, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Die vergleichende Betrachtung der Wirkungen von Phytoestrogenen und E2 zeigte in den MCF-10A Zellen nach 48 h eine vergleichbare Effektivität in der Wachstumsinhibierung von E2 ($EC_{50} = 43 \mu\text{M}$) und den Isoflavonen GEN ($EC_{50} = 35 \mu\text{M}$), EQU ($EC_{50} = 45 \mu\text{M}$) und dem Mix(EQU) ($EC_{50} = 42 \mu\text{M}$). In MCF-7 Zellen wirkten die Phytoestrogene und E2 bei niedrigen Konzentrationen proliferativ und bei hohen Dosen antiproliferativ.

4.1.2.2 MODULATION DER DNA-SYNTHESE RATE

Neben der DAPI-Methode, die dem Screening aller Testsubstanzen diene, wurde in MCF-10A und MCF-7 Zellen der Einfluss der effektivsten Isoflavone GEN und EQU zusätzlich auf die DNA-Synthese (**Kapitel 3.2.1.6.2**) untersucht. E2 wurde als Referenzsubstanz mitgeführt.

GEN und EQU reduzierten dosisabhängig die DNA-Syntheserate in MCF-10A ($\geq 10 \mu\text{M}$) und MCF-7 ($\geq 40 \mu\text{M}$) bereits nach 24 h signifikant (**Anhang Abbildung 9.5**, **Anhang Tabelle 9.8**). Die 48-stündige Inkubation führte nur in den MCF-7 Zellen zu einer noch stärkeren Wachstumshemmung (**Tabelle 4.1**). In MCF-10A Zellen war nach 24 h bereits die maximale Hemmung der DNA-Synthese erreicht. Nach 72 h war keine Detektion des BrdU-Einbaus mehr möglich (keine EC_{50} -Berechnung möglich). GEN und EQU übten im Vergleich zum DAPI-Assay keine induzierenden Einflüsse auf die DNA-Synthese in MCF-7 Zellen aus.

E2 zeigte in MCF-10A ähnliche Hemmwirkungen wie die Isoflavone, in MCF-7 jedoch stärkere inhibierende Effekte (**Tabelle 4.1**, **Anhang Tabelle 9.8**).

Tabelle 4.1: Ermittelte EC_{50} -Konzentrationen (μM) für die Testsubstanzen in MCF-10A und MCF-7 Zellen

Substanz	MCF-10A			MCF-7		
	t24	t48	t72	t24	t48	t72
Isoflavone						
GEN	6	9	-	51	38	45
EQU	20	27	10	54	44	49
Estrogene						
E2	19	17	-	17	19	10

-, EC_{50} nicht erreicht.

4.1.2.3 MODULATION DER METABOLISCHEN AKTIVITÄT

Desweiteren wurde der Effekt ausgewählter Isoflavone und E2 auf die mitochondriale (MTT-Assay; **Kapitel 3.2.1.7.1**) und zelluläre Enzymaktivität (CellTiter-Blue[®]-Assay; **Kapitel 3.2.1.7.2**) als Indikatoren für die Zahl metabolisch aktiver Zellen und die Zytotoxizität nach 48 h bestimmt. Zur besseren Darstellung der Ergebnisse wurde der Quotient aus der Enzymaktivität bezogen auf das Zellwachstum (DNA-Gehalt = 100 %) zum jeweiligen Inkubationszeitpunkt bestimmt.

In den MCF-7 Tumorzellen war keine Veränderung der mitochondrialen Aktivität infolge der Isoflavon-Behandlung zu beobachten (Ratio = 1) (**Anhang Abbildung 9.6**). Allein E2 führte zu einer erhöhten mitochondrialen Enzymaktivität bei 20-40 μM (+48-63 %) (**Abbildung 4.8**). In MCF-10A Zellen erhöhten die Phytoestrogene, mit Ausnahme von S-EQU, die mitochondriale Aktivität bezogen auf das Zellwachstum dosisabhängig, vor allem in den wachstumshemmenden Konzentrationen von $> 10 \mu\text{M}$, während E2 keine Veränderungen hervorrief (**Abbildung 4.8-4.9**).

Abbildung 4.8: Mitochondriale Enzymaktivität in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit E2 nach 48 h

Die Ergebnisse sind als das Verhältnis von mitochondrialer Aktivität zum DNA-Gehalt dargestellt, $\text{MW} \pm \text{SD}$, $n = 3$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

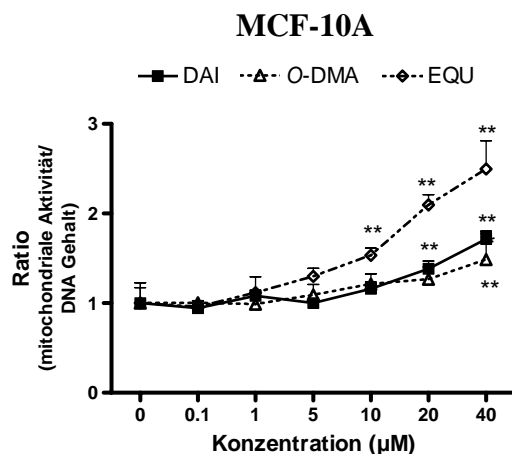
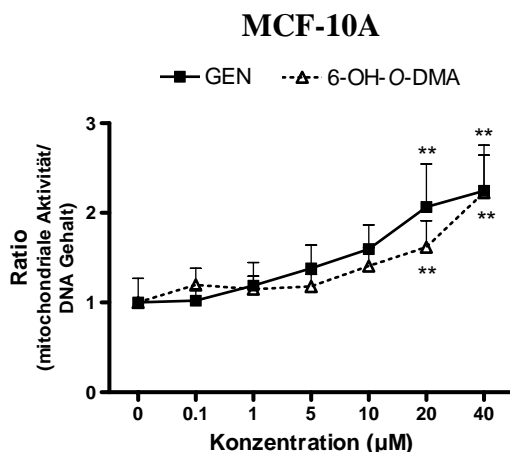
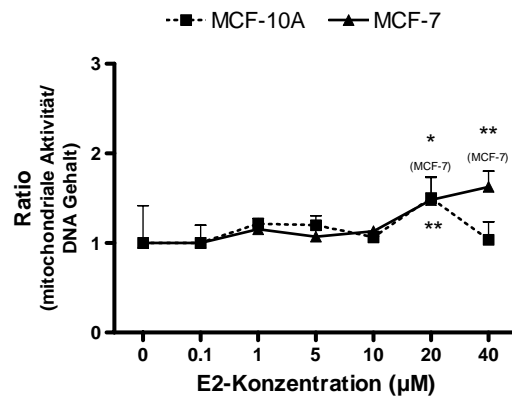


Abbildung 4.9: Mitochondriale Enzymaktivität in MCF-10A nach Inkubation mit Isoflavonen nach 48 h

Die Ergebnisse sind als das Verhältnis von mitochondrialer Aktivität zum DNA-Gehalt dargestellt, $\text{MW} \pm \text{SD}$, $n = 4$, $**p < 0,01$, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Die Effekte des synthetischen Isoflavon-Gemisches Mix(EQU) in MCF-10A Zellen weisen auf eine additive Wirkung der drei Isoflavone hin (**Abbildung 4.10**), während in den MCF-7 Zellen kein Einfluss auf die metabolische Aktivität beobachtet wurde (**Anhang Abbildung 9.6**).

Mix(EQU)	
Mix (40 μ M)	+1,7 \pm 0,3
Einzelkomponenten	
GEN (25 μ M)	+1,0
DAI (12 μ M)	+0,2
EQU (3 μ M)	+0,2
Summe der Einzelkomponenten	+1,4

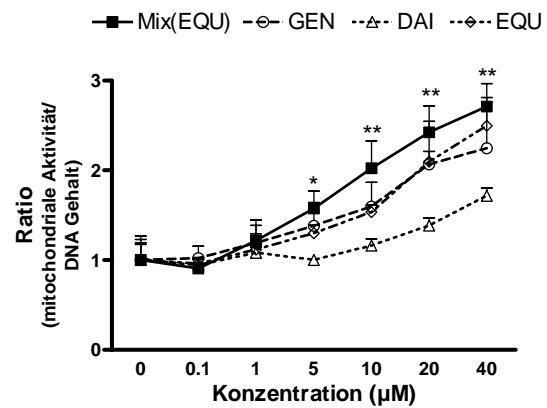


Abbildung 4.10: Darstellung der additiven Wirkung der Isoflavon-Kombination Mix(EQU) auf die mitochondriale Aktivität in MCF-10A Zellen nach 48 h

Die Ergebnisse sind als das Verhältnis von metabolischer Aktivität zum DNA-Gehalt dargestellt, MW \pm SD, n = 3, *p<0,05, **p<0,01, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Der CellTiter-Blue[®]-Assay zur Bestimmung der zellulären Enzymaktivität nach GEN-, EQU- und E2-Behandlung war weniger sensitiv wie der MTT-Assay zur Detektion der mitochondrialen Enzymaktivität. **Tabelle 4.2** zeigt die Veränderungen der zellulären metabolischen Aktivität bezogen auf den DNA-Gehalt in MCF-10A und MCF-7 Zellen, welche ausschließlich bei hohen unphysiologischen Konzentrationen beobachtet wurde.

Tabelle 4.2: Zelluläre metabolische Aktivität in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit GEN, EQU und E2 nach 48 h

Konzentration (μ M)	GEN		EQU		E2	
	MCF-10A	MCF-7	MCF-10A	MCF-7	MCF-10A	MCF-7
0	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1
0,1	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
1	0,9 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
5	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
10	1,1 \pm 0,3	0,9 \pm 0,0	1,2 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1
20	1,2 \pm 0,2	0,9 \pm 0,0	1,3 \pm 0,5	0,9 \pm 0,2	1,3 \pm 0,4	1,7 \pm 0,1 **
40	1,0 \pm 0,3	1,0 \pm 0,1	1,6 \pm 0,2 *	1,0 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1 **	2,5 \pm 0,3 **

Die Ergebnisse sind als das Verhältnis von metabolischer Aktivität zum DNA-Gehalt dargestellt, MW \pm SD, n = 3 (MCF-10A), n = 3 (MCF-7), *p<0,05, **p<0,01, signifikant in One-way-ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Zusammenfassung 4.1.2: Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Phytoestrogene antiproliferative Wirkungen in den dysplastischen MCF-10A Brustzellen ($\geq 10 \mu$ M) ausübten, während diese in den MCF-7 Tumorzellen in physiologischen Konzentrationen (0,1-10 μ M) proestrogene Aktivitäten aufwiesen. Das synthetische Isoflavon-Gemisch, das die Isoflavone GEN, DAI und EQU in physiologischen Anteilen enthielt, wirkte additiv antiproliferativ in MCF-10A und synergistisch proestrogen in MCF-7. Die metabolische Aktivität der MCF-10A wurde im Gegensatz zur Zellzahl erhöht, in MCF-7 nahm sie parallel mit der Zellzahl zu. Auf

Basis dieser Ergebnisse wurden die Konzentrationen und Inkubationszeiten für die nachfolgenden Untersuchungen festgelegt.

4.1.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR GENOTOXIZITÄT POTENZIELLER BRUSTKREBS-RISIKOFAKTOREN IN HUMANEN MAMMAZELLEN

Ziel dieser Versuche war es, den Einfluss verschiedener Modellsubstanzen potenzieller Brustkrebs-Risikofaktoren auf die DNA-Integrität der humanen Mammazelllinien MCF-10A und MCF-7 zu ermitteln. Für die mittels Comet Assay durchgeführten Untersuchungen wurden folgende Substanzen ausgewählt: E2, 4-OH-E2, H₂O₂, HNE, B(a)P, BPDE und Menadion. Diese Testsubstanzen sind Auslöser oxidativen Stresses (ROS-Bildung) und Quinon-Bildner und somit Induktoren von DNA-Schäden. Um zytotoxische Effekte der Verbindungen auszuschließen, wurde die Vitalität der Zellen nach Substanzbehandlung mittels Trypanblau-Ausschlusstest (**Kapitel 3.2.1.2**) bestimmt. Zunächst wurden Konzentrationsprofile erstellt, um die Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge zu erfassen und geeignete Substanzen und Konzentrationen für die sich anschließenden Chemoprotektionsversuche zu ermitteln.

In allen Versuchen wiesen MCF-10A nach Substanzinkubation Vitalitäten von > 80 % und MCF-7 von > 77 % auf, wodurch sichergestellt war, dass die gemessenen DNA-Schäden auf genotoxischen und nicht auf zytotoxischen Effekten beruhten.

In beiden Zelllinien ergaben sich für die im Folgenden getesteten Modellsubstanzen, ausgenommen E2, 4-OH-E2 und B(a)P, gute Dosis-Wirkungs-Beziehungen, die in der **Abbildung 4.11 A-F** dargestellt sind.

Die Ergebnisse der 2-stündigen E2 bzw. 4-OH-E2-Inkubationsversuche zeigt **Abbildung 4.11 A**. Die Basis-Schadensrate betrug bei den MCF-10A $7,2 \pm 2,4$ % und bei den MCF-7 $12 \pm 3,8$ %. In beiden Mammazelllinien wirkten die Estrogene nicht genotoxisch, jedoch scheint ein dosisabhängiger Anstieg der DNA-Schädigung in den MCF-7 Zellen möglich (1 μ M). Dieser erwies sich aber aufgrund der hohen Standardabweichungen als nicht signifikant. Daraufhin wurde für die MCF-7 Zellen ein exakteres E2-Konzentrationsprofil (10 nM – 1 mM) erstellt, wobei auch der Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten (1 h, 4 h, 24 h) einbezogen wurde. Die Inkubation fand bei 1 h und 4 h in Suspension, bei 24 h in Zellkulturflaschen mit adhärenenten Zellen statt. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Art der Inkubation zeigte sich ein Unterschied in den basalen DNA-Schadensraten. Nach 1 h in Suspension betrug die TI $9,1 \pm 3,2$ %, nach 4 h in Suspension $11 \pm 3,1$ % und nach 24 h in der Kulturflasche $6,2 \pm 0,1$ %. Nach Normalisierung der TI auf die der Kontrolle (DMSO) war kein signifikanter Anstieg der DNA-Schäden ersichtlich (**Anhang Abbildung 9.7**).

Das genotoxische Potential von Menadion, eines Quinons, ist in **Abbildung 4.11 B** dargestellt. In den MCF-10A Zellen wirkten 10 μM mit einem TI-Wert von $28 \pm 12 \%$ signifikant DNA-schädigend (Kontrolle TI = $6,8 \pm 2,1 \%$), während in MCF-7 bereits 5 μM signifikante DNA-Schäden setzte (TI = $25 \pm 7,0 \%$ versus Kontrolle TI = $7,2 \pm 2,1 \%$). Der Vergleich der beiden Zelllinien ergab signifikante Unterschiede von $p < 0,01$ in den beiden höchsten Konzentrationen von 5 μM und 10 μM .

In **Abbildung 4.11 C** ist zu erkennen, dass H_2O_2 ab einer Konzentration von 18,75 μM in MCF-10A und ab 14 μM in MCF-7 signifikante DNA-Schäden induzierte (MCF-10A: TI = $24 \pm 11 \%$ und MCF-7: TI = $34 \pm 8,0 \%$ versus Kontrolle MCF-10A: TI = $6,6 \pm 3,8 \%$ und MCF-7: TI = $11 \pm 0,6 \%$). Die Analyse mittels Two-way ANOVA ergab bei 14 μM und 18,75 μM signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien ($p < 0,01$ und $p < 0,05$).

Auch für HNE wurde ein eindeutiger Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhang nachgewiesen. HNE wirkte in MCF-10A ab einer Konzentration von 150 μM mit einem TI-Wert von $16 \pm 4,7 \%$ signifikant DNA-schädigend (Kontrolle TI = $7,2 \pm 1,8 \%$). In MCF-7 waren $> 75 \mu\text{M}$ (TI = $19 \pm 5,6 \%$ versus Kontrolle TI = $7,2 \pm 0,7 \%$) genotoxisch (**Abbildung 4.11 D**). Der Vergleich der beiden Zelllinien ergab signifikante Unterschiede in den beiden höchsten Konzentrationen von 100 μM und 150 μM .

Auch bei den Modellsustanzen aus der Gruppe der umwelt- und ernährungsrelevanten Risikofaktoren, den PAKs, ergaben sich signifikante Sensitivitätsunterschiede in den Zellmodellen, mit höherer Empfindlichkeit der MCF-7 Krebszellen. Während die 30-minütige Inkubation mit B(a)P in MCF-10A keine DNA-Schäden induzierte, stieg die DNA-Strangbruchrate in MCF-7 ab 100 μM signifikant an (von TI = $11 \pm 3,1 \%$ auf TI = $21 \pm 4,5 \%$) (**Abbildung 4.11 E**). Im Gegensatz dazu wurde für den aktiven B(a)P-Metaboliten BPDE in beiden Zellmodellen eine eindeutige Konzentrations-Wirkungs-Beziehung nachgewiesen (**Abbildung 4.11 F**). Als signifikant genotoxische Dosen wurden in MCF-10A 50 μM und in MCF-7 20 μM verifiziert. Die gemessenen TI für MCF-10A und MCF-7 betrugen $37 \pm 12 \%$ und $30 \pm 0,6 \%$ (Kontrolle: MCF-10A: TI = $8,7 \pm 3,9 \%$, MCF-7: TI = $11 \pm 3,1 \%$).

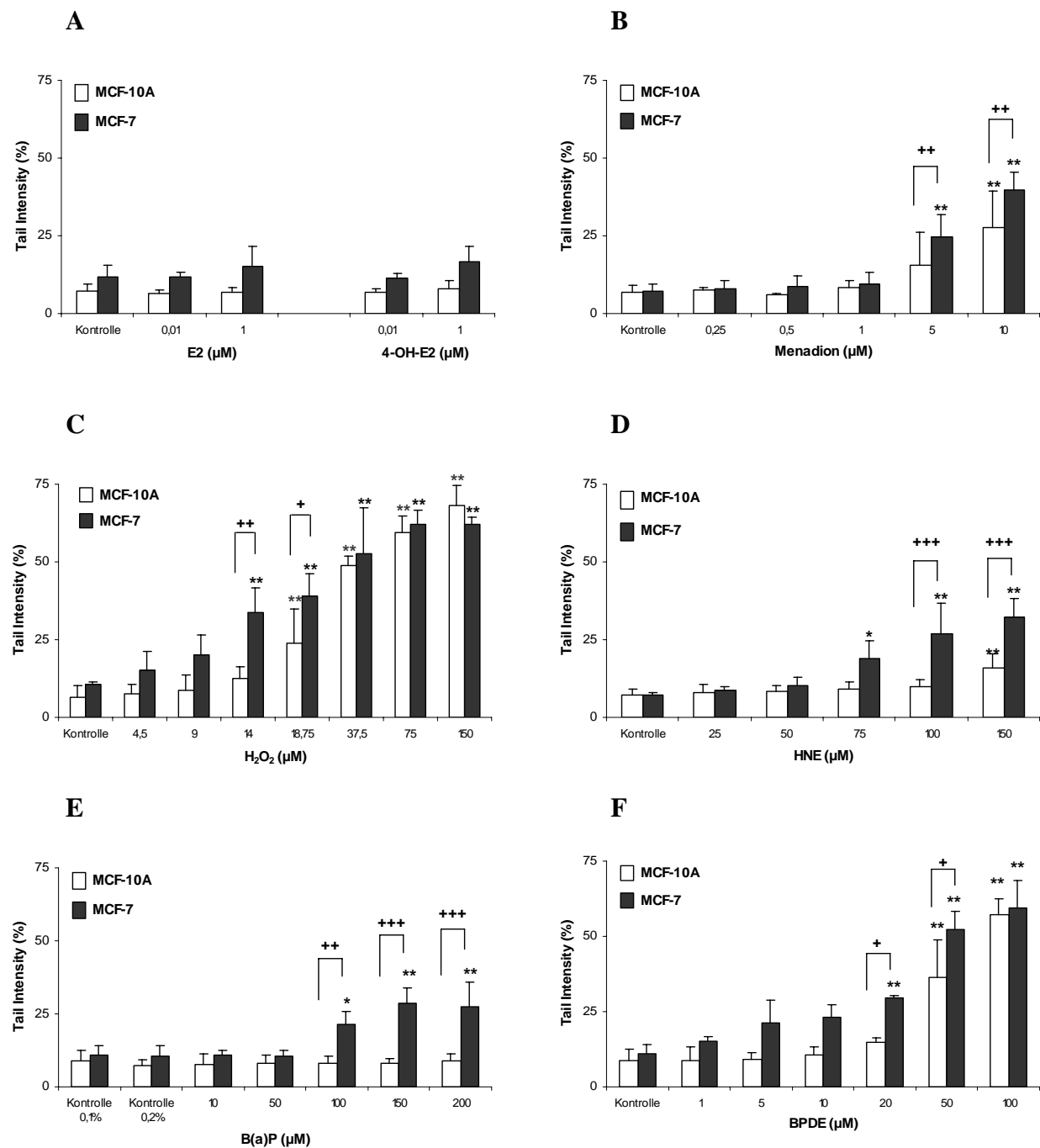


Abbildung 4.11: Induktion von DNA-Strangbrüchen in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit (A) E2 und 4-OH-E2 (2 h), (B) Menadion (30 min), (C) H₂O₂ (5 min), (D) HNE (30 min), (E) B(a)P (30 min), (F) BPDE (30 min)

Angaben als MW \pm SD, $n = 3$ (E2, Menadion, H₂O₂, HNE, B(a)P, BPDE), $n = 6$ (4-OH-E2), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest, + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$, signifikant in Two-way ANOVA mit Bonferroni Posttest.

Aus den vorangegangenen Versuchen ging deutlich hervor, dass die transformierten MCF-7 Zellen im Vergleich zu den primär-ähnlichen MCF-10A Zellen empfindlicher auf die Risikosubstanzen reagierten. Zur Erklärung dieses Phänomens können viele Mechanismen in Frage kommen, u. a. die unterschiedlich effektive Reparaturkapazität der Zellen. Es ist bekannt,

dass ER(-) Mammazellen eine verbesserte Reparaturkapazität aufweisen als ER(+) Mammazellen [287].

Die MCF-7-Reparaturkapazität der Einzel- und Doppelstrangbrüche wurde unter Verwendung von H_2O_2 untersucht. Dafür wurden die Zellen mit $18,75 \mu M$ H_2O_2 geschädigt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min lagen die durch H_2O_2 -induzierten DNA-Schäden bei $TI = 38 \pm 5,8 \%$. Bereits nach 30 min waren diese signifikant um 66 % ($TI = 13 \pm 6,8 \%$) verringert, blieben aber auch nach 120 min Reparatur noch statistisch signifikant erhöht ($TI = 19 \pm 11 \%$) (**Abbildung 4.12**).

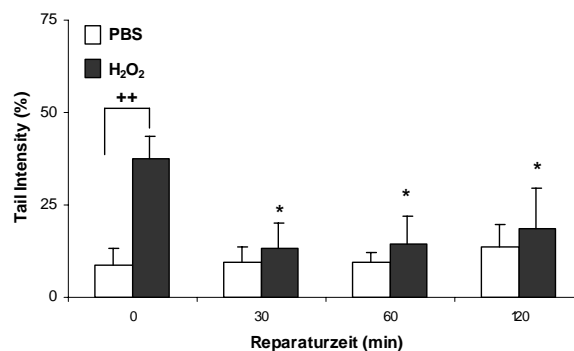


Abbildung 4.12: Reparatur von H_2O_2 -induzierten DNA-Schäden in MCF-7 (0-120 min Reparatur).

Angaben als $MW \pm SD$, $n = 3$, Reparaturzeitpunkt versus Kontrolle ($t=0$ min) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest, behandelte Zellen versus unbehandelte Zellen + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$, signifikant in Two-way ANOVA mit Bonferroni Posttest.

*Zusammenfassung 4.1.3: Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die transformierten MCF-7 Zellen gegenüber verschiedenen genotoxischen Modellsubstanzen sensibler reagierten. Das war nicht mit einer verminderten DNA-Reparaturkapazität assoziiert. Der Reparaturverlauf der H_2O_2 -induzierten Schäden war vergleichbar mit dem anderer Zelllinien (Kolon) [264]. Die vergleichende Betrachtung der Konzentrationsprofile ergab für die Zelltypen folgende Rangfolge in der genotoxischen Substanzwirkung: BPDE induzierte in MCF-10A Zellen die stärksten DNA-Schäden, gefolgt von Menadion, H_2O_2 und schließlich HNE, während in MCF-7 Zellen H_2O_2 am stärksten DNA-schädigend wirkte, gefolgt von BPDE, Menadion, B(a)P und HNE. Anhand dieser Versuche wurden die Konzentrationen für die Chemoprotektionsversuche festgelegt (**Tabelle 3.11**).*

4.2 DIFFERENZIELLE EXPRESSION FREMDSTOFF-METABOLISIERENDER UND OXIDATIVER STRESS-ASSOZIIERTER ENZYMSYSTEME

Im Folgenden wurden die am Metabolismus der Risikofaktoren beteiligten Enzymsysteme untersucht. Dazu zählen antioxidative Enzymsysteme sowie Phase II-Enzymsysteme [215]. Zu den antioxidativen Enzymen des Körpers gehören u. a. Katalase, GSH-Peroxidase, GSH-Reduktase, mikrosomale GSTs und Metallothioneine. Phase II-Enzyme mit Relevanz zu den hier betrachteten Risikosubstanzen sind u. a. GSTs, UGTs, NQO1, SULTs, COMT. Zu den bedeutendsten Schutzsystemen des Brustepithels gehören die GSTs und die NQO1 [159], die daher in dieser Arbeit genauer untersucht wurden.

4.2.1 DIFFERENZIELLE GENEXPRESSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine cDNA-Array Technik (**Kapitel 3.2.2.3**) verwendet, mit der die Expression von 192 Genen gleichzeitig erfasst werden konnte. Hierfür kamen zwei Membranen zum Einsatz. Auf der einen Membran waren Gene des Fremdstoff-metabolismus, die mit der Giftung (Phase I), Metabolisierung (Phase II) und dem Ausschleusen (Phase III) von Xenobiotika assoziiert sind, gespottet und auf der zweiten Membran Gene, die mit oxidativem Stress assoziiert sind. Als Referenzspots auf jeder Membran dienten Housekeeping Gene (10 Spots, Positivkontrollen) sowie Blanks (6 Spots, Negativkontrollen). Listen der Gene sind unter www.superarray.com (GEArray Q Series HS11, HS12) zu finden.

Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die Expression der signifikant differenziell zwischen MCF-10A und MCF-7 exprimierten Gene aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Tabelle 4.3: Differenziell exprimierte Gene in MCF-10A und MCF-7

cDNA Array	Funktionelle Genfamilie	Differenziell exprimierte Gene zwischen MCF-10A und MCF-7
Fremdstoff-Metabolismus (HS11)	Phase I-Enzyme	
	P450 Genfamilie	-
	Phase II-Enzyme	
	Acetyltransferasen	ACAT1, ACAT2, CHAT, DLAT, MORF, NAT1, NAT5
	Epoxidhydrolasen	LABH1
	Glutathion S-Transferasen	GSTA2, GSTA3, GSTM3, GSTM5, GSTT2, MGST1, MGST3
	Methyltransferasen	HNMT, NNMT
	Sulfotransferasen	CHST6, SULT2B1, TPST1
	UDP Glykosyltransferasen	UGT1A1, UGT2B, UGT2B10
	Phase III-Enzyme	
	Metallothioneine	MT1A, MT1E, MT1L, MT2A, MT3
	P-Glykoproteinfamilie	ABCC5, ABCG2

cDNA Array	Funktionelle Genfamilie	Differentiell exprimierte Gene zwischen MCF-10A und MCF-7
Oxidativer Stress (HS12)	Proliferation & Karzinogenese	Cyclin D1, Cyclin G, EGR1
	Wachstumsarrest & Seneszenz	GADD153, GADD45A
	Inflammation	IL1A, IL18
	Oxidativer & Metabolischer Stress	CYP2E, MnSOD, GSTM3, MT1A, MT2A
	Hitzestress	HSPA1A, HSPA6, HSPB1
	DNA Schädigung & Reparatur	ERCC4, RAD23, RAD53, UNG, XRCC2
	Apoptose	BCL2L2, CASP1, CASP8

Für den Metabolismus der genotoxischen Verbindungen sind die in **Abbildung 4.13** dargestellten antioxidativen und Phase II-Enzymsysteme von besonderem Interesse. Die *hGSTA4* lag bei beiden Zelllinien unter dem Cut Off-Level und *hGSTP1* ergab ein falsches Expressionsmuster, wie die nachfolgenden Untersuchungen zeigten.

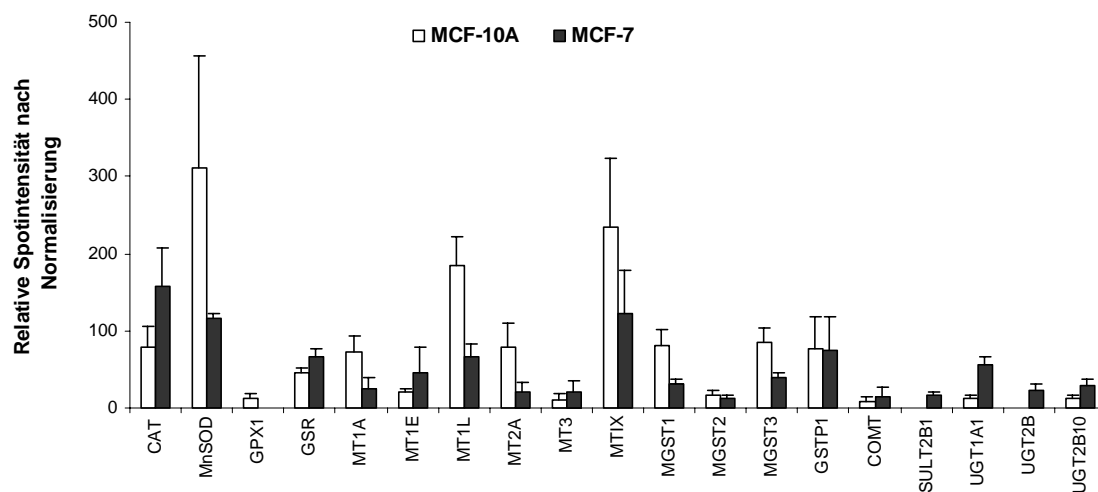


Abbildung 4.13: Expressionsmuster antioxidativer und Phase II-Enzymsysteme in MCF-10A und MCF-7

Angaben als MW \pm SD, n = 3, CAT: Katalase, MnSOD: Mangan-Superoxiddismutase, GPX1: GSH-Peroxidase, GSR: GSH-Reduktase, MT: Metallothioneine, MGST: mikrosomale GSTs, COMT: Catechol-O-Methyltransferase, SULT: Sulfotransferase, UGTs: UDP-Glucuronosyltransferase.

MCF-10A zeigten eine stärkere mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme MnSOD, GPX1, MTs und MGSTs, während MCF-7 CAT und GSR stärker exprimierten. Bezüglich der Phase II-Enzyme COMT, SULTs und UGTs wiesen MCF-7 eine höhere basale mRNA-Expression auf. Gene der DNA-Reparatur (*XRCC*, *ERCC*) waren in MCF-10A höher exprimiert.

4.2.2 STATUS DES GLUTATHION / GLUTATHION S-TRANSFERASEN SYSTEMS IN HUMANEN MAMMAZELLEN

Die Untersuchungen des GST-Status in MCF-10A und MCF-7 Zellen erfolgte zusätzlich zum cDNA-Array mit weiteren molekularbiologischen Techniken. Die betrachteten Parameter umfassten die basale GST-Isoenzym-Expression auf Genebene, die basalen Konzentrationen

der zytosolischen GSTs auf Proteinebene, den zytosolischen Gesamtproteingehalt, die katalytische GST-Gesamtaktivität sowie den intrazellulären GSH-Gehalt.

Die Basalexpression der humanen GST-Isoenzyme auf Transkriptionsebene wurde mittels qualitativer RT-PCR (**Kapitel 3.2.2.1**) detektiert. In **Tabelle 4.4** sind die Expressionsmuster der humanen GSTs beider Zelllinien dargestellt. Eine Abbildung der PCR-Produkte nach erfolgter Gelelektrophorese ist im Anhang gezeigt (**Anhang Abbildung 9.8**).

Tabelle 4.4: Basale mRNA-Expression der humanen GST-Isoenzyme

GST Isoenzyme	<i>hGSTA1</i>	<i>hGSTA2</i>	<i>hGSTA4</i>	<i>hGSTM1</i>	<i>hGSTM2</i>	<i>hGSTP1</i>	<i>hGSTT1</i>	<i>hGSTT2</i>
MCF-10A	-	-	+	+	-	+	-	+
MCF-7	+	+	+	+	-	+	-	-

+ exprimiert, - nicht detektiert, (n = 2)

Die mRNA-Expression der Isoenzyme *hGSTA4* und *hGSTP1* wurde zusätzlich quantifiziert (**Kapitel 3.2.2.4**). MCF-10A Zellen zeigten eine 2,5-fach höhere *hGSTA4* mRNA-Expression ($17 \pm 9,4$ ng in MCF-10A, $6,8 \pm 1,5$ ng in MCF-7) und eine ca. 66.000-fach höhere *hGSTP1* mRNA-Expression als MCF-7 ($9,9 \pm 1,8$ ng in MCF-10A, $1,5 \times 10^{-4} \pm 1,1 \times 10^{-4}$ ng in MCF-7).

Für einige GST-Isoenzyme sind genetische Polymorphismen beschrieben, die möglicherweise deren katalytische Aktivität und damit die Anfälligkeit der Zellen gegenüber den entsprechenden Substraten beeinflussen [226]. Deshalb wurden die Zelllinien auf die in der Literatur beschriebenen Deletionspolymorphismen in den Genen *hGSTM1* und *hGSTT1* [226] und den Polymorphismus des *hGSTP1*, basierend auf einer Punktmutation im Kodon 104 [288], untersucht. *GSTP1*A* stellt den Wildtyp dar. *GSTP1*B* und *GSTP1*C* sind Träger der Mutation (A→G). Dies führt zum Einbau der Aminosäure Valin statt Isoleucin. *GSTP1*C* enthält zusätzlich noch eine Transition im Kodon 113, welche den Einbau von Alanin statt Valin bewirkt. Die funktionelle Konsequenz der *GSTP1*B* und *GSTP1*C* Genotypen zeigt sich in einer veränderten katalytischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Das Auftreten des *GSTM1* und *GSTT1* Nullgenotyps sowie *GSTP1* Polymorphismen stellen eine Risikoerhöhung für die Entwicklung eines Mammakarzinoms dar [289;290].

Die DNA-Analyse der *GSTM1* und *GSTT1* Nullpolymorphismen wurde mittels Multiplex-PCR (**Kapitel 3.2.2.2.3**), die des *GSTP1* Polymorphismus mittels RFLP-PCR (**Kapitel 3.2.2.2.4**) durchgeführt. MCF-10A zeigten den *GSTT1*0* Genotyp, während das funktionelle *hGSTM1* Gen in beiden Zelllinien exprimiert war (**Anhang Abbildung 9.9**). Beide Zelllinien exprimierten den heterozygoten Genotyp *GSTP1*A*B* (**Anhang Abbildung 9.10**).

Weitere Parameter des GSH/GST-Systems wie die basalen Proteinkonzentrationen der zytosolischen GSTs, der zytosolische Gesamtproteingehalt, die katalytische GST-Aktivität

sowie der intrazelluläre GSH-Gehalt sind in **Tabelle 4.5** zusammengefasst. Die Konzentrationen der mittels Western Blot (**Kapitel 3.2.3.4**) nachgewiesenen hGSTA1/2, M1-1, M2-2 und P1-1 wurden auf der Basis der Zellzahl und des zytosolischen Proteingehaltes berechnet. Die hGSTA4-4 wurde aufgrund des Mangels an Standardprotein nicht quantifiziert.

Tabelle 4.5: Quantifizierung der Parameter des GSH/GST-Systems in MCF-10A und MCF-7

Zellen	GST Protein (ng)								GST Aktivität (nmol x min ⁻¹)		GSH (nmol)	Gesamt- protein (µg)
	A1/2		M1-1		M2-2		P1-1					
	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen	10 ⁻⁶ Zellen
MCF-10A	3 ± 1	9 ± 4	1	5	n. d.	n. d.	532 ± 251	3434 ± 893	35 ± 15	214 ± 92	6 ± 2	152 ± 116
	(n=5)		(n=1)		(n=1)		(n=9)		(n=8)		(n=18)	(n=8)
MCF-7	5 ± 3	9 ± 1	9	14	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,35 ± 0,4	3 ± 2	11 ± 4	152 ± 87
	(n=2)		(n=1)		(n=1)		(n=2)		(n=9)		(n=10)	(n=9)

Angaben als MW ± SD; n, Anzahl der unabhängigen Experimente; n. d., nicht detektierbar

Die Isoenzyme hGSTA1/2, hGSTA4-4, hGSTM1-1 wurden von beiden Zelllinien exprimiert, hGSTP1-1 nur in MCF-10A und hGSTM2-2 war in beiden Zellen nicht nachweisbar (**Tabelle 4.5, Anhang Abbildung 9.11**). Während der zytosolische Gesamtprotein-gehalt in den Zelllinien vergleichbar war, zeigten MCF-10A im Vergleich zu den MCF-7 deutlich höhere GST-CDNB-Aktivitäten, die bezogen auf 1 Millionen Zellen ca. 100-fach und bezogen auf das Gesamtprotein ca. 71-fach höher lagen. Hinsichtlich des intrazellulären GSH-Gehaltes unterschieden sich die Brustzellen nicht (**Tabelle 4.5**).

4.2.3 STATUS DER NAD(P)H: QUINONOXIDOREDUKTASE IN HUMANEN MAMMAZELLEN

Für die Untersuchungen zur Modulation der NQO1 in den humanen Mammazelllinien MCF-10A und MCF-7 wurden zunächst die basale Expression auf Genebene und Proteinebene sowie die katalytische NQO-Aktivität bestimmt.

Die basale *hNQO1* Genexpression wurde in den MCF-10A und MCF-7 Zelllinien mittels qualitativer RT-PCR (**Kapitel 3.2.2.1**) und quantitativer real-time RT-PCR (**Kapitel 3.2.2.4**) detektiert. Der *hNQO1* mRNA-Gehalt in MCF-10A betrug $4,5 \pm 1,9$ ng und war somit ca. 66 % geringer als in den MCF-7, die eine Basisexpression von $15 \pm 5,6$ ng *hNQO1* mRNA zeigten. Das hNQO1-1 Protein, das beide Mammazellen exprimierten, konnte aufgrund des Mangels an NQO1-Standardprotein nicht quantifiziert werden. Die Bestimmung der zytosolischen NQO1-Aktivität erfolgte in 96-well-MTPs (**Kapitel 3.2.3.7**). Somit war es nicht möglich, die Zellzahl bzw. den Proteingehalt als Bezugsbasis für die Aktivität zu ermitteln. Aber unter Betrachtung

der Absorptions-Rohwerte, die zur Auswertung herangezogen wurden, zeigten MCF-7 Zellen 3-fach höhere Werte im Vergleich zu MCF-10A Zellen.

Zusammenfassung 4.2: Die Ergebnisse der differentiellen Expression Fremdstoff-metabolisierender und oxidativer Stress-assoziiierter Enzymsysteme zeigten, dass sich die Mammazellen in der Genexpression von sowohl antioxidativen als auch detoxifizierenden Enzymsystemen unterschieden. MCF-10A besaßen im Allgemeinen eine höhere basale Genexpression antioxidativer Enzyme (MnSOD, GPX1, MTs, MGSTs) sowie Reparaturenzyme (ERCC, XRCC), MCF-7 eine höhere basale Genexpression detoxifizierender Enzyme (COMT, SULT, UGT). Betrachtete man das GSH/GST- und das NQO1-System im Speziellen, dann zeigten MCF-10A eine bessere GST-Isoenzymausstattung auf Gen- und Proteinebene, die in einer höheren GST-Gesamtaktivität resultierte. Dagegen wiesen MCF-7 eine höhere basale NQO1-Expression auf.

4.3 MODULATION FREMDSTOFF-METABOLISIERENDER UND OXIDATIVER STRESS-ASSOZIIERTER ENZYMSYSTEME DURCH PHYTOESTROGENE IN HUMANEN MAMMAZELLEN

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das protektive Potential der Phytoestrogene im Initiationsstadium der Mammarkarzinogenese bewertet werden. Einen wichtigen Mechanismus der Chemoprävention stellt dabei die Induktion antioxidativer und detoxifizierender Enzymsysteme dar.

Basierend auf der Wirkungskraft der Isoflavone und Lignane in MCF-10A und MCF-7, die mittels DAPI-Assay bestimmt wurde, wurden für die folgenden Experimente GEN, EQU und ENL als Testsubstanzen ausgewählt. Es sollte deren modulierender Einfluss auf die Genexpression Fremdstoff-metabolisierender und oxidativer Stress-assoziiierter Enzymsysteme, u. a. GSTs und NQO1, in humanen Mammazelllinien untersucht werden.

4.3.1 MODULATION DER DIFFERENZIELLEN GENEXPRESSION DURCH GEN

Da die cDNA-Array-Technik eine kostenaufwendige Methode darstellt, wurde im Rahmen dieser Experimente nur die wirksamste Substanz, das GEN, getestet. Beide Zelllinien wurden für 24 h mit 1 μ M und 10 μ M GEN und 10 nM E2 behandelt (**Kapitel 3.2.2.3**).

Für die statistische Auswertung der Genexpression wurden die normalisierten, über dem Cut off-Wert liegenden Werte von 2 bzw. 3 unabhängigen Versuchen gemittelt und mittels t-Test auf Signifikanz geprüft. Weiterhin wurden der „Fold Change“ und der „Golub Faktor“ berechnet [291]. Diese Parameter geben an, um wieviel sich die Expression eines Gens der

behandelten Zellen von der Expression eines Gens der Kontrollzellen unterscheidet. Der „Golub Faktor“ („signal to noise ratio“) ist definiert als der Betrag der Differenz der Mittelwerte von behandelten und unbehandelten Zellen dividiert durch die Summe der Standardabweichungen der behandelten und unbehandelten Zellen. Je höher dieser Zahlenwert des Golub-Kriteriums ist, umso sicherer ist ein Gen differenziell exprimiert. In **Tabelle 4.6** sind die signifikant durch GEN und E2 modulierten Gene in MCF-10A und MCF-7 dargestellt.

Tabelle 4.6: Signifikant modulierte Gene in MCF-10A und MCF-7 nach 24-stündiger Inkubation mit GEN und E2

GEN 1 μM					GEN 10 μM				E2 10 nM				
Gene		Fold Change	Golub Faktor		Gene		Fold Change	Golub Faktor		Gene		Fold Change	Golub Faktor
MCF-10A													
HS11	SULT1B1	* ↑	6,9	1,0	MGST3	** ↑	1,7	2,0		NAT1	* ↑	2,4	7,9
					UGT1A1	* ↑	1,8	1,2					
HS12	BCL2L2	** ↓	0,3	5,2	BCL2L2	** ↓	0,3	5,3					
	XRCC2	* ↑	2,5	2,2	XRCC2	* ↑	3,1	3,6					
					MT1H	* ↓	0,8	1,0					
MCF-7													
HS11	CYP2F1	* ↓	0,5	5,2	CYP2F1	** ↓	0,6	9,1		CYP2B	* ↓	0,5	1,7
	GSTM5	* ↓	0,7	4,5	GSTT2	* ↓	0,7	2,4		ACAT2	** ↓	0,6	2,1
	GSTT2	* ↓	0,6	3,2	HNMT	* ↑	2,5	2,7		ABCC2	* ↓	0,6	1,6
	HAT1	* ↑	2,1	3,3	NAT1	* ↑	1,3	3,0		ABCC5	* ↓	0,4	1,4
	HNK-1ST	* ↓	0,6	3,9	NAT5	* ↑	1,8	3,5		ABCG2	** ↓	0,6	2,4
	MT1G	* ↓	0,5	2,8	MORF	* ↓	0,4	2,4					
	MT1H	** ↓	0,6	5,9	MT1L	* ↑	1,5	3,5					
	MT3	* ↓	0,4	5,3	MT3	* ↓	0,4	3,5					
	UGT1A1	* ↓	0,4	3,7	UGT1A1	* ↓	0,6	1,8					
				UGT2B10	* ↓	0,7	0,4						
HS12	HSP105B	* ↑	1,4	1,3	DNAJA1	* ↑	2,0	1,2		CAT	** ↓	0,6	2,0
					HSPB1	* ↓	0,7	1,9		CYP1A1	* ↓	0,3	1,9
					HSPD1	* ↑	1,5	1,9		CYP2E	** ↓	0,2	1,9
										HSP105B	* ↑	1,3	1,5
										HSPD1	* ↑	1,9	1,4
										MDM2	* ↑	1,9	1,4
										XRCC2	* ↑	2,1	1,3
										XRCC4	** ↑	1,9	2,6
										XRCC5	** ↑	1,6	2,0

↑ Zunahme der Genexpression, ↓ Abnahme der Genexpression, n = 2-3, *p<0,05, **p<0,01, signifikant im ungepaarten t-Test.

SULT: Sulfotransferase, HNK-1ST: HNK-1 Sulfotransferase, UGT: UDP-Glucuronosyltransferase, MGST: mikrosomale Glutathion S-Transferase, GST: Glutathion S-Transferase, XRCC: humanes DNA-Reparatur Protein, MT: Metallothioneine, CYP: Cytochrom P450 Monooxygenase, NAT: N-Acetyltransferase, HAT1: Histon-Acetyltransferase 1, MORF: Histon Acetyltransferase, HNMT: Histamin N-Methyltransferase, ACAT2: Acetyl-CoA-Acetyltransferase 2, ABCC, ABCG2: ATP-binding Cassette, HSP: Hitzeschock-Proteine, MDM2: p53-bindendes Protein, BCL2L2: Bcl-2, CAT; Katalase.

Während in MCF-10A Zellen Gene protektiver Enzyme (*GST*, *SULT*, *UGT*) durch GEN signifikant hochreguliert wurden, wurden diese Gengruppen (*GST*, *MT*, *UGT*) in MCF-7 Zellen größtenteils herunterreguliert. Zudem sind DNA-Reparaturgene (*XRCC2*) in MCF-10A infolge GEN-Behandlung verstärkt und das antiapoptotische *Bcl-2* vermindert exprimiert. In MCF-7 werden diese nicht moduliert. E2 zeigte in MCF-10A kaum Auswirkung auf die Genexpression, während in MCF-7 zahlreiche Gene moduliert wurden. Gene des oxidativen und metabolischen Stresses wurden signifikant herunterreguliert (*CAT*, *CYP*), Gene des Wachstumsarrestes (*MDM2*) und der DNA-Reparatur (*XRCC*) wurden signifikant hochreguliert.

4.3.2 INDUZIERBARKEIT DES GLUTATHION/GLUTATHION S-TRANSFERASEN SYSTEMS

Die Untersuchungen der Testsubstanzen GEN, EQU und ENL (0-30 μM) und der Referenzsubstanz E2 (10 nM) hinsichtlich ihres GSH/GST-System-modulierenden Potentials wurden nach 48 h Inkubation durchgeführt. Dabei wurden speziell die Isoenzyme hGSTA4-4 und hGSTP1-1 betrachtet, da diese bedeutende Entgiftungsenzyme im Metabolismus der Brustkrebs-Risikofaktoren HNE und BPDE darstellen und zudem auch bei der Bekämpfung von oxidativem Stress. Die Ergebnisse zur Aktivität und Proteinexpression der GSTs (ausser hGSTA4-4 aufgrund des Fehlens eines geeigneten Standardproteins) wurden sowohl auf die Zellzahl als auch auf das zytosolische Protein bezogen.

GEN stellte den effektivsten Induktor der GST-Gesamtaktivität, bezogen auf die Zellzahl, in MCF-10A und EQU in MCF-7 dar (**Abbildung 4.14**). GEN induzierte die Aktivität in MCF-10A dosisabhängig, zeigte aber erst bei 30 μM Signifikanz (4,7-fach). In MCF-7 wurde die GST-Aktivität durch 10 μM und 30 μM EQU signifikant erhöht (3,2- bzw. 2,5-fach). ENL und E2 modulierten die GST-Aktivität nicht.

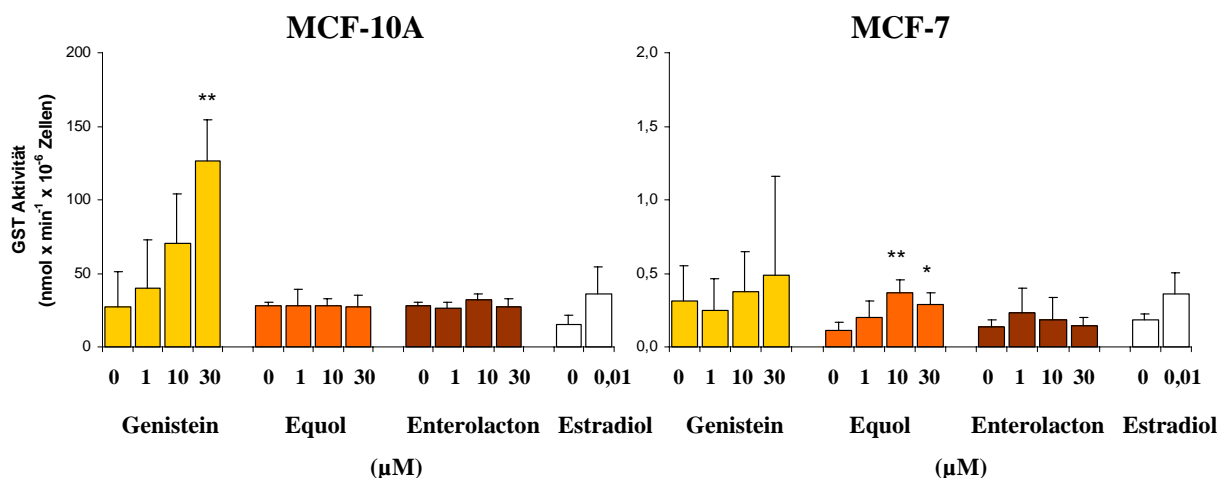


Abbildung 4.14: Induktion der GST-Aktivität auf der Basis der Zellzahl in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2

Angaben in MW \pm SD, n = 3-4, Behandlung versus Kontrolle: *p<0,05, **p<0,01, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Die GST-Aktivität auf Basis des Proteingehaltes wurde durch keine der Substanzen in den Mammazelllinien moduliert (**Anhang Abbildung 9.12**).

Die Inkubation mit 30 μM GEN resultierte in einem signifikanten Anstieg des zytosolischen Proteingehaltes in MCF-10A (2,5-fach), während EQU, ENL und E2 in beiden Zelllinien keinen Einfluss hatten (**Abbildung 4.15**).

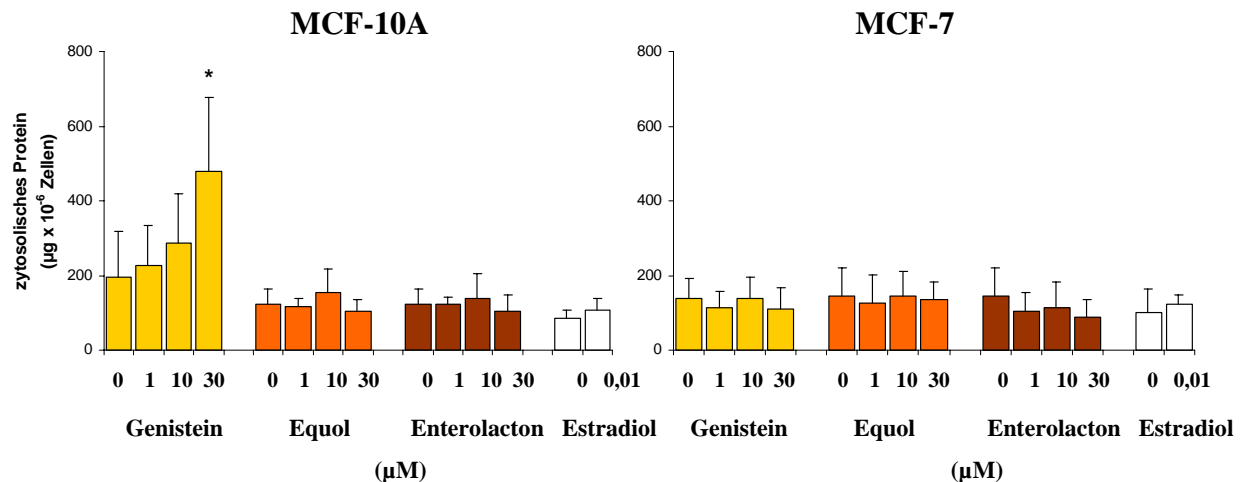


Abbildung 4.15: Modulation des zytosolischen Proteingehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2

Angaben in MW \pm SD, n = 3-4, Behandlung mit 30 μM GEN versus Kontrolle: *p<0,05, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Um den Zusammenhang der erhöhten GST-Aktivität zur Proteinexpression für Brustzellen relevanter Isoenzyme herzustellen, wurde der immunobiochemische Nachweis der GST-Isoenzyme hGSTP1-1 und hGSTA4-4 durchgeführt. Die Untersuchungen der hGSTP1-1 Proteinexpression wurden ausschließlich in MCF-10A Zellen vorgenommen, da das Isoenzym in MCF-7 Zellen nicht nachweisbar war (**Kapitel 4.4.2**). Die hGSTP1-1 Expression, bezogen auf die Zellzahl, nicht aber auf das zytosolische Protein, wurde in MCF-10A durch 30 μM GEN signifikant induziert (3,1-fach). EQU, ENL und E2 beeinflussten die hGSTP1-1 nicht (**Abbildung 4.16**, **Anhang Abbildung 9.13**). Keine der Substanzen führte zu Veränderungen der hGSTA4-4-Spiegel in den Zelllinien (**Anhang Abbildung 9.14**).

MCF-10A

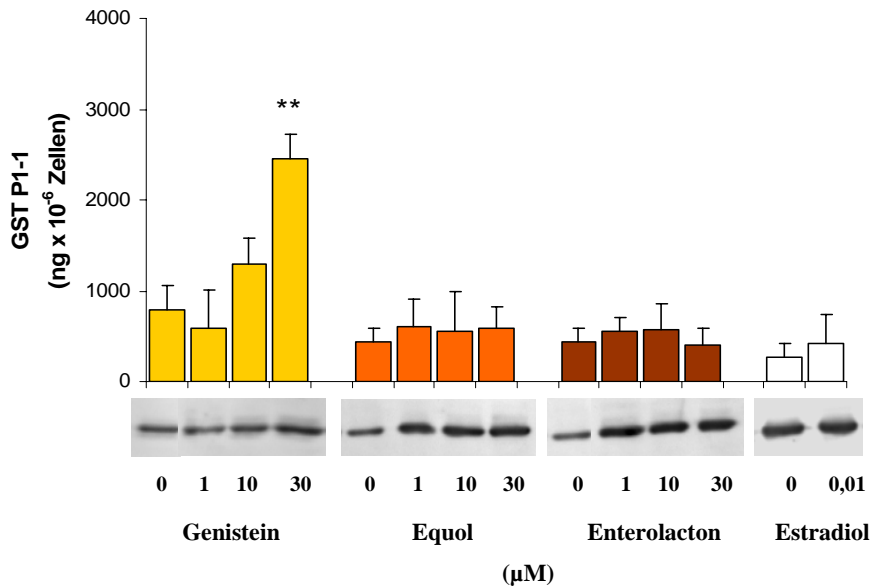


Abbildung 4.16: Modulation der hGSTP1-1 Proteinexpression auf der Basis der Zellzahl in MCF-10A nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2

Angaben als MW \pm SD, n = 3-5, Behandlung mit 30 μ M GEN versus Kontrolle: **p<0,01, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Das Resultat der induzierten hGSTP1-1 Proteinexpression geht konform mit den Ergebnissen der Induktion der GST-Gesamtaktivität und des zytosolischen Proteingehaltes durch 30 μ M Genistein. Das hGSTP1-1 Protein korrelierte dabei stark mit der in den MCF-10A Zellen ermittelten GST-Gesamtaktivität (**Abbildung 4.17**) zeigt, woraus geschlossen werden kann, dass die Induktion der GST-Gesamtaktivität hauptsächlich auf der erhöhten hGSTP1-1 Proteinkonzentration beruht.

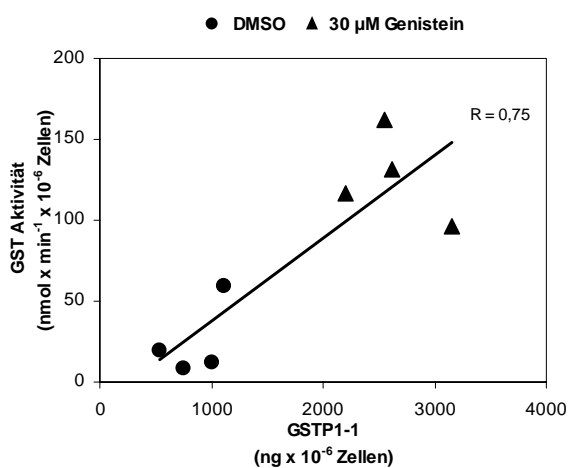


Abbildung 4.17: Korrelation zwischen hGSTP1-1 Protein und GST-Aktivität in MCF-10A Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 30 μ M GEN

r, Korrelationskoeffizient nach Pearson

Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die Induktion der GST-Aktivität und der Proteinexpression durch GEN, dem effektivsten Induktor, auf einer erhöhten *hGSTP1* und *hGSTA4* mRNA-Expression beruhten. Die mRNA-Expression der GST-Isoenzyme wurde auf β -Aktin mRNA bezogen, welches als interne Kontrolle der real-time RT-PCR (**Kapitel 3.2.2.4**) diente. Die Untersuchungen der *hGSTP1* Genexpression wurden ausschließlich in MCF-10A durchgeführt, da das Protein in MCF-7 nicht nachweisbar war (**Kapitel 4.4.2**) und die mRNA-Konzentration am Detektionslimit lag (**Kapitel 4.4.2**).

Wie **Abbildung 4.18** zeigt, war die *hGSTP1* mRNA bereits nach 8 h in den mit 30 μ M GEN behandelten MCF-10A Zellen signifikant erhöht (1,3-fach). Die Induktion verstärkte sich nach 24 h und 48 h dosisabhängig. Dabei zeigten bereits physiologisch erreichbare Konzentrationen von 1 und 10 μ M induzierende Wirkungen, wobei die 48-stündige Behandlung die stärkste Induktion hervorrief (2,3- bzw. 1,7-fache Induktion).

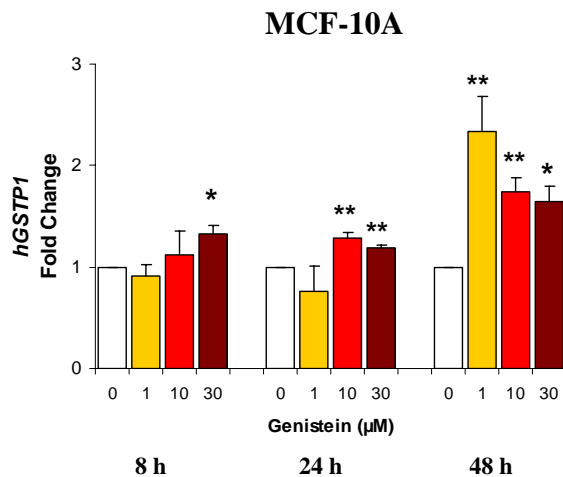


Abbildung 4.18: Modulation der *hGSTP1* mRNA-Expression bezogen auf β -Aktin mRNA in MCF-10A nach 8-, 24- und 48-stündiger GEN-Behandlung

Auswertung nach Comparative C_T Method ($Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta CT}$), Angaben als MW \pm SD, n = 3, GEN versus Kontrolle: *p<0,05; **p<0,01, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Bezüglich der Modulation der *hGSTA4* mRNA unterschieden sich die beiden Zelllinien wesentlich voneinander (**Abbildung 4.19**). Die GEN-Behandlung verminderte die *hGSTA4* mRNA-Expression in MCF-10A nach 24 h (1 μ M, -60 %) und 48 h (1, 10, 30 μ M, -50 %, -30 %, -50 %) signifikant. In MCF-7 induzierte GEN (30 μ M) nach 8 h zunächst die mRNA-Expression (1,3-fach) und reduzierte diese aber nach 24 h (-40-60 %) wieder. Eine Langzeitbehandlung von 48 h zeigte in den MCF-7 Zellen keinen Effekt auf *hGSTA4* mRNA.

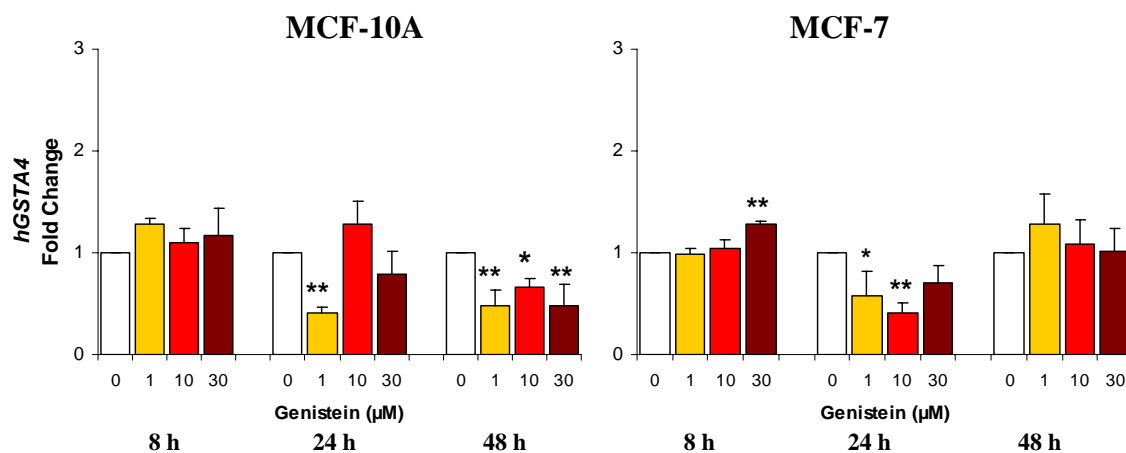


Abbildung 4.19: Modulation der *hGSTA4* mRNA-Expression bezogen auf β -Aktin mRNA in MCF-10A und MCF-7 nach 8-, 24- und 48-stündiger GEN-Behandlung

Auswertung nach Comparative CT Method ($Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta CT}$), Angaben als MW \pm SD, n = 3, GEN versus Kontrolle: *p<0,05; **p<0,01, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Die GST-Enzyme benötigen für die Katalyse der Entgiftungsreaktionen GSH als Kofaktor. Somit wurde auch der Einfluss der Testsubstanzen auf den intrazellulären GSH-Spiegel

untersucht. In MCF-10A wurde die intrazelluläre GSH-Konzentration durch 30 μM GEN nach 48 h signifikant erhöht (1,4-fach), in MCF-7 durch 30 μM EQU (1,6-fach). ENL und E2 hatten keinen Einfluss auf die GSH-Spiegel der Mammazellen (**Abbildung 4.20**).

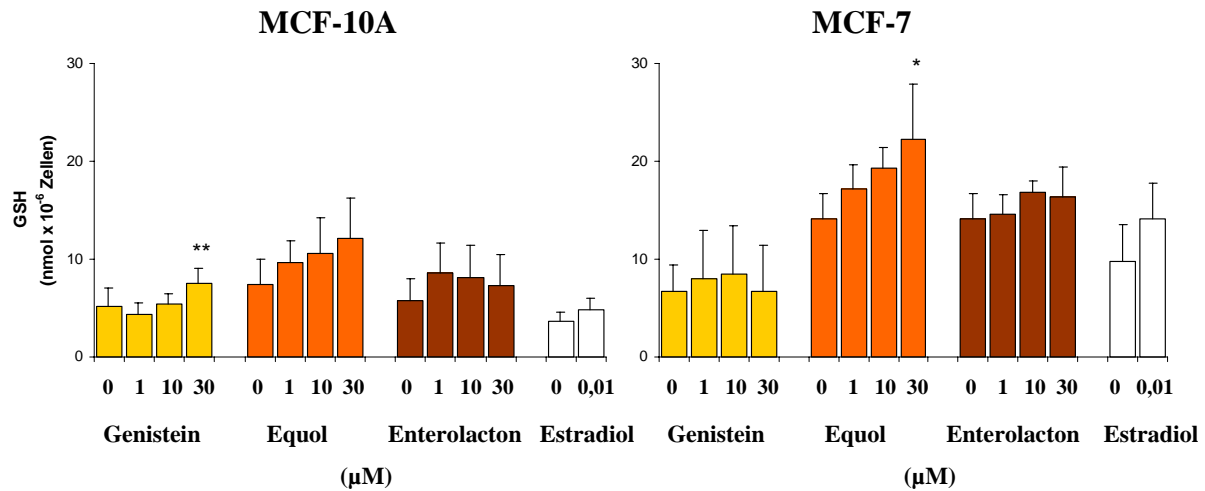


Abbildung 4.20: Modulation des intrazellulären GSH-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2

Angaben in MW \pm SD, n = 5-7, 30 μM GEN und EQU versus Kontrolle: *p<0,05, **p<0,01, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

4.3.3 INDUZIERBARKEIT DER NAD(P)H: QUINONOXIDOREDUKTASE

Die Untersuchungen der Testsubstanzen GEN, EQU, ENL (0-30 μM) und E2 (10 nM) hinsichtlich ihres NQO1-modulierenden Potentials fanden nach 48-stündiger Inkubation statt.

In MCF-10A erhöhten 10 μM und 30 μM GEN die NQO-Aktivität um das 1,5- und 1,4-fache und 30 μM ENL um das 1,2-fache. EQU und E2 zeigten keinen Effekt in MCF-10A. Keine der Testsubstanzen modulierte die NQO-Aktivität in MCF-7 Zellen (**Abbildung 4.21**).

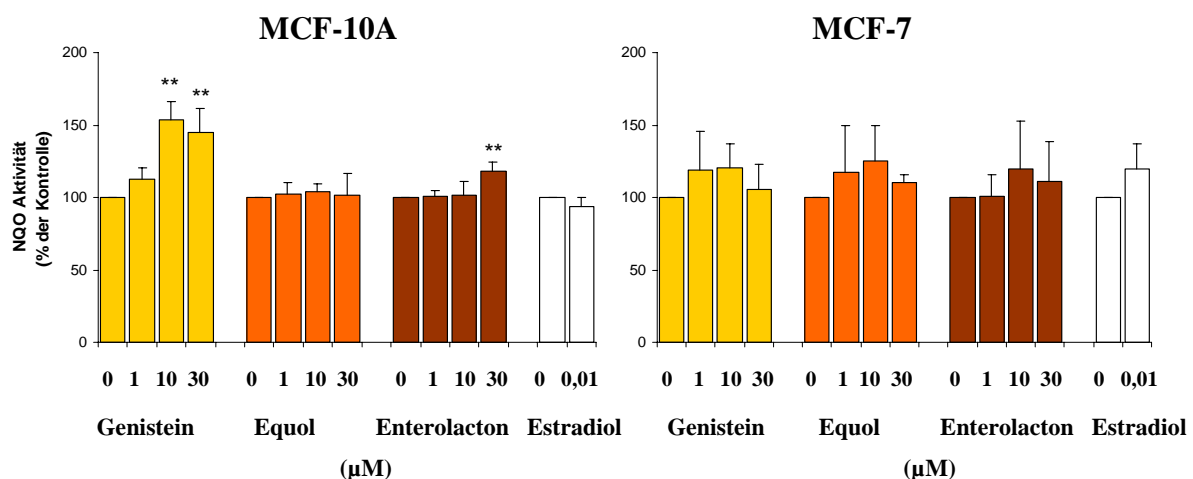


Abbildung 4.21: Induktion der NQO-Aktivität in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2

Angaben in MW \pm SD, n = 4-5, GEN und EQU versus Kontrolle: **p<0,01, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Da die NQO1-Aktivität in MCF-10A Zellen nach 48 h durch GEN und ENL induziert war, wurde unter diesen Bedingungen die Expression des hNQO1-1 Proteins untersucht. Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Standardproteins konnte die Proteinexpression nicht auf Zellzahl oder Gesamtprotein bezogen werden. Als Bezugsgröße diente die interne Kontrolle β -Aktin.

GEN induzierte die hNQO1-1 Proteinexpression in den MCF-10A signifikant (30 μ M, 3,4-fach), während die Inkubation mit 10 und 30 μ M EQU zu einer ca. 40 %igen Reduktion des Proteins führte. ENL zeigte keinen Effekt in diesen Zellen. In den Tumorzellen MCF-7 hatte die Inkubation mit Phytoestrogenen keinen Einfluss auf die Proteinexpression (**Abbildung 4.22**). Die Referenzsubstanz E2 modulierte die hNQO1-1 Expression in keiner der untersuchten Zelllinien.

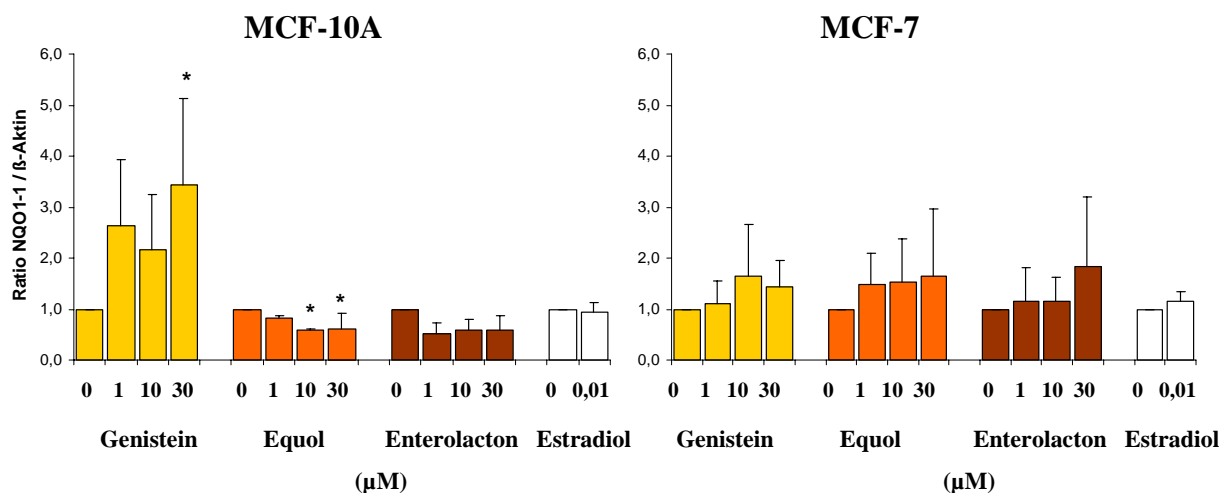


Abbildung 4.22: Modulation der hNQO1-1 Proteinexpression in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2

Angaben als MW \pm SD, n = 3-4, Behandlung versus Kontrolle: *p<0,05, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Ebenso wie die NQO-Aktivität wurde die hNQO1-1 Proteinexpression in MCF-10A Zellen durch 30 μ M GEN signifikant induziert. Das hNQO1-1 Protein korrelierte dabei mit der in den Proben ermittelten NQO-Enzymaktivität, wie **Abbildung 4.23** zeigt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die GEN-vermittelte Induktion der NQO-Aktivität in den MCF-10A Zellen hauptsächlich auf der erhöhten hNQO1-1 Proteinexpression beruht.

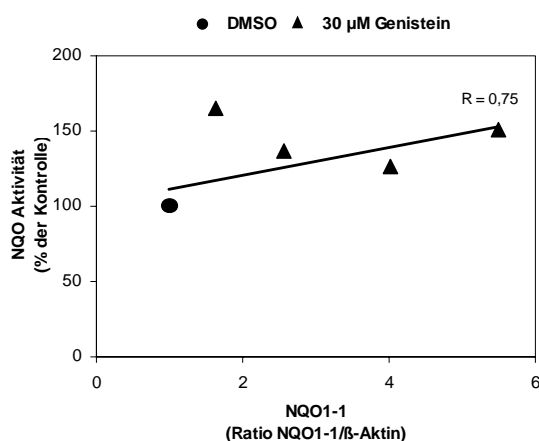


Abbildung 4.23: Korrelation zwischen hNQO1-1 Protein und NQO-Aktivität in MCF-10A Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 30 μ M GEN

r, Korrelationskoeffizient nach Pearson

Da GEN unter den ausgewählten Phytoestrogenen die stärksten Effekte auf das NQO1-Enzymsystem zeigte, wurden die Zellen analog zu den GST mRNA-Expressionsanalysen mit GEN für 8 h, 24 h und 48 h behandelt. Die mRNA-Expression (**Kapitel 3.2.2.4**) wurde auf β -Aktin mRNA, die interne Kontrolle der real-time RT-PCR, bezogen.

Die Inkubation mit 30 μ M GEN führte über die Zeit zu einer signifikanten Induktion der *hNQO1* mRNA in MCF-10A. Die maximale Induktion (2,6-fach) war nach 24 h erreicht. Im Gegensatz dazu steht die Reduktion der *hNQO1* mRNA-Expression in MCF-7. Die 24 h Inkubation führte zu einer 60 %igen Reduktion (1 μ M GEN), die sich nach 48 h noch weiter verstärkte (1-30 μ M: -40-70 %) (**Abbildung 4.24**).

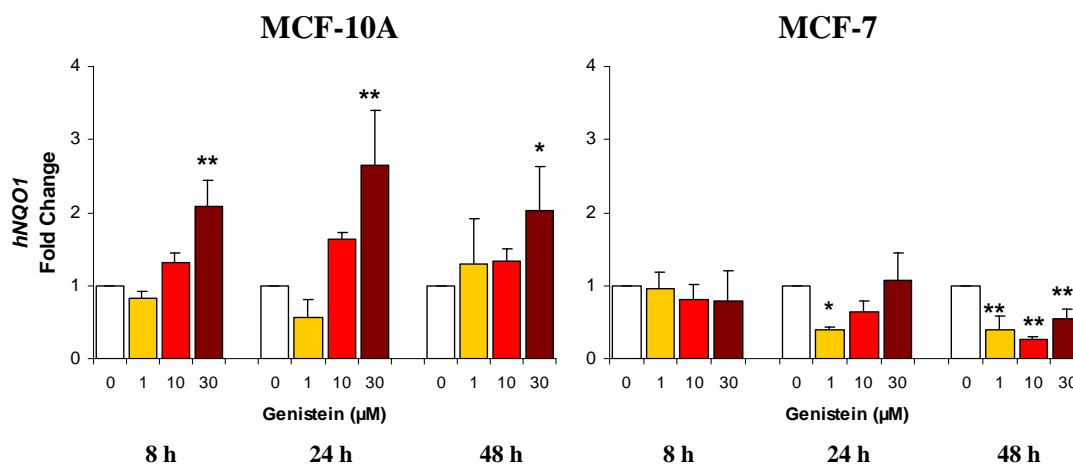


Abbildung 4.24: Modulation der *hNQO1* mRNA-Expression bezogen auf β -Aktin mRNA in MCF-10A und MCF-7 nach 8-, 24- und 48-stündiger GEN-Behandlung

Auswertung nach Comparative C_T Method ($Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta C_T}$), Angaben als MW \pm SD, n = 3, GEN versus Kontrolle: *p<0,05; **p<0,01, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest.

Zusammenfassung 4.3: Die Ergebnisse zur Modulation Fremdstoff-metabolisierender und oxidativer Stress-assoziiierter Enzymsysteme haben gezeigt, dass die Phytoestrogene unterschiedliche Wirksamkeit in den Mammazellen aufwiesen. Während GEN Gene, die Phase II-Enzymsysteme kodieren, in MCF-10A hochregulierte, führte in vielen Fällen die Behandlung zu einer Herunterregulation dieser Gene in MCF-7. GEN war der effektivste Induktor des GSH/GST-Enzymsystems in MCF-10A auf Aktivitäts-, Protein- und mRNA-Ebene, während EQU geringe induzierende Aktivitäten in MCF-7 ausübte (GST-Aktivität-Erhöhung). GEN führte ausserdem zur Induktion des zytosolischen Proteingehaltes der MCF-10A, worin die Ursache für die unterschiedlichen Induktionsfaktoren (4,7-fach und 2,1-fach) auf Zellzahl- und Proteinebene zu sehen war. Die intrazelluläre Konzentration des GST-Kofaktors GSH wurde in MCF-10A durch GEN und in MCF-7 durch EQU erhöht. Unter Betrachtung eines weiteren Phase II-Enzyms, der NQO1, zeigte GEN ebenfalls die stärkste induzierende Wirkung in MCF-10A auf Aktivitäts-, Protein- und mRNA-Ebene. NQO1 wurde in MCF-7 auf mRNA-Ebene

herunterreguliert und auf Protein- und Aktivitätsebene nicht moduliert. Somit zeigten die nicht-transformierten MCF-10A Zellen einen verbesserten Phase II-Enzymstatus nach Inkubation mit Phytoestrogenen.

4.4 EINFLUSS DER PHASE II-ENZYMINDUKTION AUF DIE GENOTOXIZITÄT

Dieser Teil der Arbeit hatte zum Ziel, die Konsequenzen einer erhöhten Phase II-Enzymexpression auf die Entgiftungskapazität der Zellen zu untersuchen und zu prüfen, inwieweit diese Modulation zu einer verbesserten Chemoprotektion beiträgt. Für die mittels Comet Assay durchgeführten Untersuchungen wurden drei Substanzen mit genotoxischem Potential (HNE, BPDE, Menadion) ausgewählt, welche gleichzeitig Substrate der hGSTP1-1, hGSTA4-4 und hNQO1-1 darstellen. Als chemoprotektive Substanzen wurde GEN gewählt. Dies deshalb, weil die vorausgegangenen Untersuchungen zeigten, dass GEN nach 48 h die GST- und NQO-Gesamtaktivität aufgrund erhöhter hGSTP1-1 und hNQO1-1 Konzentrationen in MCF-10A am stärksten induzierte. Um auszuschließen, dass die in den Zellen gemessenen DNA-Schäden auf zytotoxischen Effekten der schädigenden Agenzien beruhten, wurde die Vitalität der Zellen nach der Substanzbehandlung mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt.

4.4.1 AUSWIRKUNGEN AUF DIE GENOTOXIZITÄT VON HNE UND BPDE

HNE, welches bei der Lipidperoxidation endogen gebildet wird, und BPDE, der aktivierte Metabolit des PAK B(a)P, stellen Substrate für verschiedene GST-Isoenzyme (GSTA4-4, GSTM1-1, GSTP1-1) dar (**Abbildung 1.4**) [224;228]. Sie wurden ausgewählt, da sie aufgrund ihrer hohen Reaktivität gegenüber Lipiden und DNA als relevante Risikofaktoren in der Mammarkarzinogenese diskutiert werden. Deren effektive Wirkkonzentrationen in den Zelllinien sind in Vorversuchen (**Kapitel 4.3, Tabelle 3.11**) ermittelt wurden.

Die induzierten DNA-Schäden waren nicht auf zytotoxische Wirkungen der genotoxischen Agenzien zurückzuführen. Die Vitalitäten beider Zelllinien lagen bei den GEN-vorbehandelten MCF-10A und MCF-7 Zellen im Durchschnitt > 85 %, bei EQU-behandelten MCF-10A Zellen bei > 71 % und MCF-7 Zellen bei > 82 %. Da die Vitalitätsbestimmung erst jeweils 2 h nach der Inkubation durchgeführt werden konnte, muss dies als Ursache für die reduzierte Vitalität der Zellen in Betracht gezogen werden.

HNE wirkte in beiden Zelllinien genotoxisch, wobei die gemessenen induzierten DNA-Schäden bei MCF-10A trotz höherer schädigender Dosis im Vergleich zu MCF-7 deutlich niedriger waren (MCF-10A: TI = $8,0 \pm 1,3$ %, MCF-7: TI = $45 \pm 7,1$). In Bezug auf die BPDE-induzierten Schadensraten unterschieden sich die Zellen nicht wesentlich voneinander

($TI = 44 \pm 6,2 \%$, MCF-7: $TI = 47 \pm 1,7 \%$). Die DNA-Schadensraten (ohne Isoflavon-Vorinkubation) wurden zum besseren Vergleich der beiden Zelllinien auf 100 % normalisiert.

In den MCF-10A wurden HNE- und BPDE-induzierte DNA-Schäden durch GEN signifikant unterdrückt (**Abbildung 4.25**).

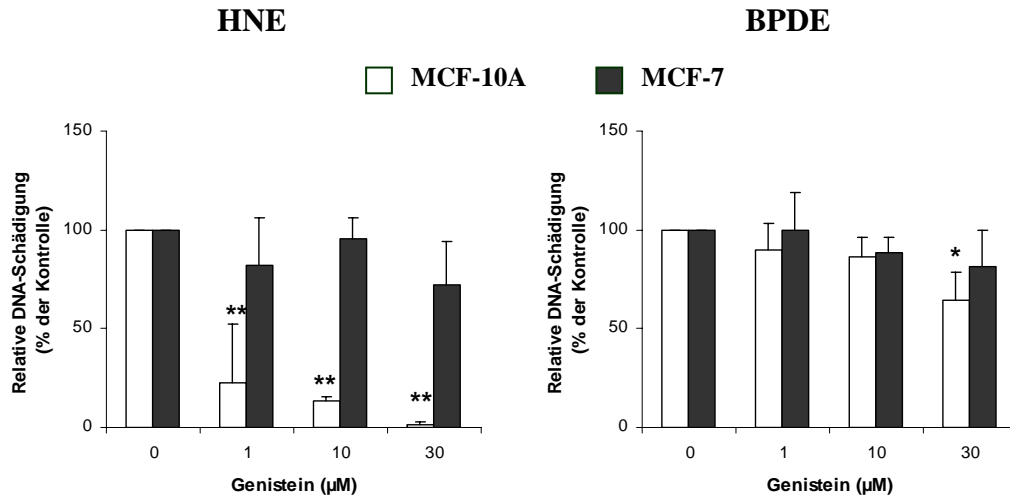


Abbildung 4.25: Effekte einer 48-stündigen Vorinkubation mit GEN und nachfolgender Behandlung mit HNE und BPDE (30 min) auf die DNA-Integrität von MCF-10A und MCF-7 Zellen

Angaben als $MW \pm SD$, $n = 3$, GEN-vermittelte Effekte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest. Effektive HNE-Konzentrationen wurden in Vorversuchen (Kapitel 4.3) ermittelt und betrugen für MCF-10A $150 \mu M$ und für MCF-7 $75 \mu M$. Die effektiven BPDE-Konzentrationen betrugen für MCF-10A $50 \mu M$ und für MCF-7 $20 \mu M$.

Interessant war, dass die GEN-vermittelte Chemoprotektion gegen HNE bereits bei physiologisch relevanten Konzentrationen ($1-10 \mu M$) klar erkennbar war. GEN ($1-30 \mu M$) reduzierte die TI im Vergleich zu den nicht behandelten MCF-10A signifikant um 77–99 %. Gegenüber BPDE zeigte das Isoflavon eine schwächere Wirkkraft. Die $30 \mu M$ GEN-Vorbehandlung resultierte in einer Schadensreduktion von 35 %. In MCF-7 zeigte GEN keine chemoprotektiven Effekte gegenüber HNE- und BPDE-induzierter Genotoxizität (**Abbildung 4.25**).

4.4.2 AUSWIRKUNGEN AUF DIE GENOTOXIZITÄT VON MENADION

Menadion, eine Modellsubstanz für Quinone, ist Substrat der hNQO1-1 (**Abbildung 1.4**). Aufgrund des Potentials der DNA-Adduktbildung bzw. der ROS-Produktion gelten Quinone als relevante Risikofaktoren in der Mammakarzinogenese. Die genotoxischen Wirkkonzentrationen wurden in Vorversuchen (**Kapitel 4.3, Tabelle 3.11**) ermittelt.

Die induzierten DNA-Schäden waren nicht auf zytotoxische Wirkungen zurückzuführen. Die durchschnittliche Vitalität betrug bei MCF-10A $> 75-79 \%$, bei MCF-7 ca. $77-87 \%$, wobei sich die vorbehandelten Zellen nicht von den unbehandelten unterschieden. Da die

Vitalitätsbestimmung jeweils 2 h nach der Inkubation durchgeführt werden konnte, muss dies als Ursache für die abnehmende Vitalität der Zellen in Betracht gezogen werden.

Menadion erzeugte in beiden Zelllinien signifikante DNA-Schäden (MCF-10A: $TI = 26 \pm 1,5 \%$, MCF-7: $TI = 49 \pm 3,6 \%$). Diese wurden auf 100 % normalisiert.

Die Menadion-induzierten DNA-Schäden konnten in MCF-10A durch 30 μ M GEN signifikant unterdrückt werden. Die Suppression der DNA-Schäden betrug 70 %. In MCF-7 zeigte GEN keine chemoprotektiven Wirkungen gegen Menadion (**Abbildung 4.26**).

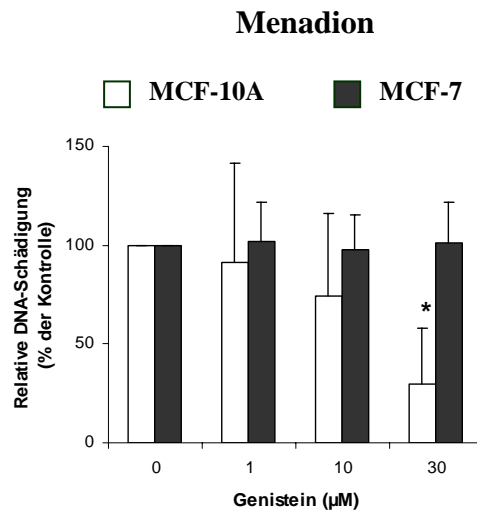


Abbildung 4.26: Effekte einer 48-stündigen Vorinkubation mit GEN und nachfolgender Behandlung mit Menadion (30 min) auf die DNA-Integrität von MCF-10A und MCF-7 Zellen

Angaben als MW \pm SD, n = 3, GEN-vermittelte Effekte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle: * $p < 0,05$, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest. Effektive Menadion-Konzentrationen wurden in Vorversuchen (s. 4.3) ermittelt und betrugen für MCF-10A 10 μ M und für MCF-7 5 μ M.

Zusammenfassung 4.4: Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Induktion der GST- und NQO1-Expression und -Aktivität in den nicht-transformierten MCF-10A Zellen durch Behandlung mit GEN und EQU entscheidenden Einfluss auf die Genotoxizität von HNE, BPDE und Menadion hatte. Dabei wurde HNE als endogener Risikofaktor bei der Karzinogenese in diesen Zellen effektiver entgiftet als BPDE und Menadion. Dagegen konnten in den tumorigenen MCF-7 Zellen keine chemoprotektiven Effekte der Isoflavone beobachtet werden.

4.5 ZELLULÄRE AUFNAHME VON GENISTEIN IN HUMANE MAMMAZELLEN

Um das Verständnis der unterschiedlichen Wachstums-Response und der unterschiedlichen Reaktion der Phase II-Enzymsysteme auf die Phytoestrogen-Inkubation zwischen nicht-tumorigenen MCF-10A und tumorigenen MCF-7 Zellen zu erhöhen, wurde am Beispiel von GEN die relative zelluläre Bioverfügbarkeit durch Bestimmung der zellulären Konzentration bestimmt (**Kapitel 3.2.5**). **Tabelle 4.7** zeigt die dosisabhängige Aufnahme von GEN in beiden Zelllinien, welche in MCF-10A zudem zeitabhängig war. In MCF-10A Zellen erhöhte sich die

intrazelluläre GEN-Konzentration nach 1-stündiger Inkubation um das 10- (1 μM) bzw. 6,6-fache (10 μM) und nach 24 h um das 12- (1 μM) bzw. 19,5-fache (10 μM). Die Absorptionsrate in MCF-7 lag zu jeder Zeit unter der der MCF-10A. Ausserdem sanken hier die intrazellulären GEN-Konzentrationen nach 24-stündiger Inkubation unter die der 1-stündigen Inkubation ab. Der anteilige GEN-Gehalt in den Membranen nach 1 h und 24 h Behandlung lag in MCF-10A mit 5-12 % unter denen der MCF-7 Zellen (10-30 %). Im Mediumüberstand der MCF-10A, aber nicht der MCF-7, waren Phase II-Metabolite detektierbar, die jedoch nicht näher analysiert wurden. Die Konzentration dieser betrug nach Inkubation mit 1 μM GEN nach 1 h 0,03 μM und nach 24 h 0,05 μM und nach Inkubation mit 10 μM GEN nach 1 h 0,4 μM und nach 24 h 0,5 μM .

Tabelle 4.7: Zelluläre Aufnahme von GEN (1 μM , 10 μM) und der Anteil an GEN in den Membranen nach 1 h und 24 h Behandlung der MCF-10A und MCF-7 Mammazellen.

		MCF-10A		MCF-7	
		1 μM	10 μM	1 μM	10 μM
GEN / Zelle (μM)	1 h	10 \pm 4	66 \pm 30	7 \pm 4	52 \pm 15
	24 h	12 \pm 2	195 \pm 19	1 \pm 1	37 \pm 9
GEN-Anteil in der Membran (%)	1 h	10 \pm 1	11 \pm 2	10 \pm 3	18 \pm 4
	24 h	5 \pm 5	12 \pm 1	30 \pm 6	22 \pm 2

Angaben in MW \pm SD, n = 3.

Zusammenfassung 4.5: Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die nicht-tumorigenen MCF-10A Zellen Phytoestrogene besser aufnahmen als die tumorigenen MCF-7 Zellen, wie hier am Beispiel des GEN beobachtet werden konnte.

5 DISKUSSION

Das Ziel der Arbeit war es, potenzielle protektive Effekte der Phytoestrogene, speziell der Isoflavone, Lignane sowie deren bakterieller Metabolite, in der Brustkrebs-Initiation unter Verwendung von *in vitro*-Zellmodellen zu bestimmen. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden an den epithelialen, dysplastischen MCF-10A Zellen durchgeführt, welche ein frühes Stadium des Karzinogeneseprozesses repräsentieren und somit ein geeignetes Modell für Untersuchungen von Mechanismen der Chemoprävention darstellen. Zum Vergleich der Wirkungen wurden die MCF-7 Zellen, ein gut etabliertes Tumorzellmodell, in die Experimente einbezogen.

5.1 UNTERSCHIEDE IN DER SENSITIVITÄT DER ZELLINIEN GEGENÜBER BRUSTKREBS-RELEVANTEN SCHUTZ- UND RISIKOFAKTOREN

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Zellmodelle unterschieden sich hinsichtlich ihres Transformationsgrades. MCF-10A Zellen wiesen Charakteristika von normalen luminalen duktalem Brustepithelzellen auf [292]. Eigene Untersuchungen haben deren epithelialen Ursprung bestätigt (**Kapitel 4.1.1.1**). Zudem besaßen die Zellen einen stabilen, nahezu diploiden Karyotyp [293]. Im Gegensatz dazu stellten MCF-7 Zellen tumorigene epitheliale Brustgewebszellen dar, gewonnen aus einer Brustfellmetastase [259;294], mit einem hochabberanten und hoch instabilen Karyotyp (**Kapitel 4.1.1.2**). Die von uns detektierten Abberationen stimmten mit denen des vom DSMZ (www.dsmz.de) veröffentlichten Karyotyp überein, wobei dieser im Gegensatz zu dem von uns ermittelten hypertetraploiden Chromosomensatz einen hypotetraploiden Chromosomensatz beschrieb. Aus der Literatur war bekannt, dass sich unabhängig voneinander kultivierte MCF-7 Stämme biologisch unterscheiden, und dass diese Unterschiede auf den veränderten Karyotyp zurückzuführen sind [295;296]. Somit sind MCF-10A Zellen ein geeigneteres Modell für Untersuchungen früher Ereignisse in der epithelialen Mammakarzinogenese und damit der Mechanismen der Chemoprävention im Vergleich zu Tumorzellen, die geeignetere Modelle für Studien zu krebstherapeutischen Aktivitäten darstellen.

Die Generationszeiten der beiden Zellmodelle unterschieden sich nicht wesentlich voneinander und betrugen für MCF-10A Zellen 23 h und für MCF-7 Zellen 30 h (**Kapitel 4.1.1.3**). In der Literatur beschriebene Verdopplungszeiten reichen von 20 h bis 35 h bei MCF-10A [258] und von 29 h (ATCC, www.atcc.org) bis 50 h (DSMZ, www.dsmz.de) bei MCF-7

Zellen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnten einheitliche Inkubationsregime für beide Zelllinien verwendet werden.

Ein weiteres wichtiges Merkmal der Zellen, das entscheidend ist für die Sensitivität gegenüber den Phytoestrogenen, ist die Expression der ER. Ursprünglich wurden die MCF-10A Zellen als ER(-) definiert [297]. Neuere Studien konnten aber eine sehr geringe *ERβ* mRNA-Expression nachweisen [260]. MCF-7 Zellen exprimieren beide ER Isoformen *ERα* und *ERβ* und werden den ER(+) Mammazelllinien zugeordnet [260].

5.1.1 PHYTOESTROGENE WIRKEN NICHT-ESTROGEN IN MCF-10A UND MCF-7 ZELLEN SOWIE ESTROGEN IN MCF-7 ZELLEN

In dieser Arbeit wurden biologische Effekte der Isoflavone und Säugerlignane hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Zellwachstum und die metabolische Aktivität der dysplastischen MCF-10A Zellen und tumorigenen MCF-7 Zellen untersucht (**Kapitel 4.1.2**). Bei den Isoflavonen wurden nicht nur GEN und DAI betrachtet, sondern auch deren bakterielle Metabolite (DHGEN, DHDAI, 6-OH-*O*-DMA, *O*-DMA, EQU) sowie ein physiologisch relevantes Isoflavon-Gemisch. Dieses setzt sich entsprechend detektierten Plasmakonzentrationen nach Sojakonsum aus 64 % GEN, 29 % DAI und 7 % EQU zusammen.

Es gibt bisher nur wenige Studien, die die bakteriellen Isoflavon-Metabolite hinsichtlich ihres zellwachstumsmodulierenden Potentials unter Verwendung von etablierten Tumorzellmodellen betrachteten. In dieser Arbeit wurden die bakteriellen GEN- und DAI-Metabolite erstmalig an nicht-tumorigenen Brustzellen (MCF-10A) untersucht. Die Proliferationsexperimente (DAPI-Assay, **Kapitel 4.1.2.1**) zeigten, dass die Isoflavone das Wachstum beider Zelltypen unter Hormon-depletierten Bedingungen hemmten und dass dieser antiestrogene Effekt in nicht-tumorigenen MCF-10A Zellen deutlicher war als in tumorigenen MCF-7 Zellen. Die dafür erforderlichen Konzentrationen von $\geq 10 \mu\text{M}$ übertrafen zwar physiologisch erreichbare Plasmakonzentrationen (10 nM-4 μM) [73;74;138], allerdings wurde von einer Akkumulation der Isoflavone im Brustgewebe berichtet [132;133]. Die proliferationshemmenden Dosen in MCF-10A Zellen waren 2-8-fach geringer als in MCF-7 Zellen. Über eine deutlicher ausgeprägte Wachstumshemmung in dysplastischen Zellen im Vergleich zu Krebszellen wurde bereits in der Literatur berichtet [298]. Zusätzlich induzierten GEN, DAI und deren bakteriellen Metabolite in den tumorigenen MCF-7 Zellen eine signifikante Wachstumsinduktion im physiologisch relevanten Konzentrationsbereich (0,1-1 μM). Der sogenannte biphasische Effekt in ER(+) Zellen ist für GEN und DAI bereits in der Literatur beschrieben [299;300].

Die vergleichende Betrachtung der Isoflavon-Verbindungen ergab, dass DHGEN und EQU ähnliche Wirkkraft wie GEN als Proliferationsinhibitoren (20-80 μM) in MCF-10A besaßen, während in MCF-7 EQU ähnlich dem GEN als starker Estrogenagonist (0,1-10 μM) wirkte. Der letztgenannte Effekt wurde durch Untersuchungen von Sathyamoorthy *et al.* bestätigt [301]. Die bakteriellen Isoflavon-Metabolite 6-OH-O-DMA, O-DMA und DHDAI nahmen nur schwachen Einfluss auf das Wachstum beider Zellmodelle. Dies konnten auch Xiang *et al.* an MCF-7 Zellen zeigen [176].

Die Ergebnisse aus der Behandlung mit dem Isoflavon-Gemisch waren von besonderer Bedeutung, da sich hier ein additiver wachstumsinhibierender Effekt in den MCF-10A und ein synergistischer proproliferativer Effekt in den malignen MCF-7 Zellen zeigte. Bereits physiologisch relevante Konzentrationen der drei Isoflavone GEN, DAI und EQU in Kombination (10 μM Mix(EQU): 6,4 μM GEN + 2,9 μM DAI + 0,7 μM EQU) hemmten das MCF-10A Zellwachstum, verstärkten aber das Wachstum der malignen MCF-7 Zellen. Synergistische Effekte in der Wachstumsreduktion von dysplastischen Zellen wurden bereits durch eine andere Kombination von Antiöstrogenen (GEN + Tamoxifen) beschrieben [298].

Die Säugerlignane ENL und END zeigten nur geringe wachstumsmodulierende Effekte in beiden Zelllinien. ENL war dabei der effektivere Metabolit. Auch hier war eine Inhibierung bei unphysiologisch hohen Dosen ($\geq 80 \mu\text{M}$) in beiden Zelllinien und eine Induktion, wenn auch sehr schwach, bei niedrigeren Dosen (5-40 μM) in malignen MCF-7 Zellen beobachtet worden. Die Datenlage für die Lignane ist begrenzt. *In vitro*-Tests an MCF-7 Tumorzellen bestätigen die Stimulation des Zellwachstums im physiologisch relevanten Konzentrationsbereich (1-8 $\mu\text{mol}/24 \text{ h}$ Urin) [302;303]. Dagegen belegen Tierexperimente die proliferationshemmenden Eigenschaften von Lignanen im Initiations- und Promotionsstadium der Tumorigenese [182].

Unser *in vitro*-Testsystem repräsentierte Hormon-depletierte Bedingungen, die die physiologischen Bedingungen *in vivo* nicht vollständig widerspiegeln. Die antiproliferativen Effekte der Isoflavone und Lignane waren in MCF-7 deutlicher, wenn Estrogene im Kulturmedium (Supplementation von FCS, **Anhang Abbildung 9.4**) enthalten waren. Bestätigung fanden diese Beobachtungen in zahlreichen *in vitro*-Untersuchungen [302;304]. Die Wirkungen der Referenzsubstanz E2 waren ähnlich denen der Isoflavone und Lignane. In MCF-7 zeigte sich ein biphasischer Effekt, während in MCF-10A ausschließlich wachstumshemmende Effekte beobachtet wurden.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann eine ER-vermittelte Induktion des Zellwachstums im physiologischen Konzentrationsbereich in den ER(+) Zellen angenommen werden.

Dagegen lassen die antiproliferativen Effekte der Phytoestrogene in hohen Konzentrationen sowohl in den ER(-) als auch ER(+) Mammazellen einen ER-unabhängigen Mechanismus der Wachstumsinhibierung vermuten. Damit bestätigen die Befunde Ergebnisse aus älteren Arbeiten. Die Isoflavone GEN und DAI gelten in geringen Konzentrationen als vollständige Agonisten für ER α und ER β [305]. Sie stimulieren auf diese Art das Wachstum kultivierter Mammazellen sowie die Expression des auf Estrogene ansprechenden *pS2* Gens [306;307]. Diese Wirkungsvermittlung via ER α und ER β wurde für die Lignane aufgrund der geringen estrogenen Aktivität ausgeschlossen [308]. Im Gegensatz dazu wirken Phytoestrogene in hohen Dosen (>20 μ M), vielfach gezeigt am Beispiel des GEN und DAI, wachstumsinhibierend, sowohl in ER(-) als auch in ER(+) Zellen [176;298;300;306;307]. Dies führte zu der Hypothese, dass diese hemmenden Effekte nicht auf den antiestrogenen ER-vermittelten Eigenschaften der Phytoestrogene beruhen. Zugrundeliegende Wirkmechanismen sind möglicherweise eine Hemmung der Tyrosinkinasen wie z. B. IGF-I und EGF [180;309], eine Unterbrechung des Zellzyklus in der G2/M Phase teilweise aufgrund der Herunterregulation von Cyclin B und Hochregulation von p21^{WAF1} sowie die Induktion der Apoptose durch eine Hochregulation der Bax-Expression [176;300;310-312].

Die Untersuchungen zum Einfluss von GEN und EQU auf die DNA-Syntheserate (BrdU-Assay, **Kapitel 4.1.2.2**) zeigten in beiden Zellmodellen ausschließlich antiproliferative Wirkungen. In den MCF-10A Zellen war die Bestimmung der DNA-Syntheserate nach 72-stündiger Behandlung großen Schwankungen unterworfen. Dies führte zu der Annahme, dass die Substanzen bereits starken Einfluss auf den Zellzyklus (Zellzyklus-Arrest, Apoptoseinduktion) genommen hatten, so dass nur noch eine geringe Anzahl replizierender Zellen vorlag.

Im Gegensatz zur Proliferationshemmung beobachteten wir eine Induktion der metabolischen Aktivität infolge der Isoflavon-Behandlung in dysplastischen MCF-10A Zellen (≥ 10 μ M) (**Kapitel 4.1.2.3**). Diese Resultate bestätigen Arbeiten von Pagliacci *et al.*, die für GEN eine Wachstumsinhibierung basierend auf der Zellzahlbestimmung durch direktes Auszählen nicht aber auf Grundlage der mitochondrialen Aktivität beschrieben [313]. Diese Beobachtungen wurden auf Veränderungen in der Neuverteilung der Zellen in den Zellzyklus-Phasen zurückgeführt. Zellzyklus-Arrest beeinflusst die Anzahl und/oder Funktion der Mitochondrien nachweislich und kann im programmierten Zelltod münden. In MCF-7 Zellen entsprechen die Isoflavon-vermittelten Effekte denen, die in den DAPI-Experimenten ermittelt wurden.

Die Ergebnisse der Wachstumsuntersuchungen zeigen, dass Isoflavone und Lignane in Abhängigkeit vom Typ der Zielzellen entweder chemoprotektive oder tumorprogressionsfördernde biologische Effekte hervorrufen. Die exakte Übertragbarkeit der *in vitro*-Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation ist dabei begrenzt. Dennoch weisen epidemiologische [57] und Tierstudien [182;314] darauf hin, dass Phytoestrogene besonders effektiv in frühen Stadien der Mammakarzinogenese wirken, bevor der Brustkrebs-Phänotyp vollständig etabliert ist. Sie unterstützen somit die Hypothese, dass diese Verbindungen eine wichtige Rolle in der Prävention maligner Brusttumore spielen.

5.1.2 MCF-7 ZELLEN REAGIEREN SENSITIVER AUF DNA-SCHÄDIGENDE SUBSTANZEN ALS MCF-10A

Desweiteren wurden die mittels Comet Assay quantifizierten Ergebnisse zur Sensitivität dysplastischer MCF-10A Zellen und tumorigener MCF-7 Zellen gegenüber genotoxischen Brustkrebsrisikofaktoren gezeigt (**Kapitel 4.1.3**). Als Modellsubstanzen wurden E2 und sein aktivierter Metabolit 4-OH-E2 als Vertreter der endogenen Hormone, H₂O₂ als Vertreter der ROS, HNE als Vertreter der reaktiven Lipidperoxydationsprodukte, B(a)P und sein aktivierter Metabolit BPDE als Vertreter der Umweltchemikalien und Menadion als Vertreter quinoider Verbindungen wie z. B. Estrogen-Quinone gewählt. Mit dem hier verwendeten alkalischen Comet Assay lassen sich Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen und DNA-Crosslinks messen. Zusätzlich werden DNA-Exzisionsreparaturstellen als Einzelstrangbrüche erfasst, nicht aber die oxidierten Basen [315].

Allen Substanzen ist gemeinsam, dass sie die Entstehung von ROS induzieren können, welche aufgrund ihrer hohen Reaktivität nicht in den Zellen akkumulieren, sondern sich im zellulären System mit nukleophilen Proteinen, Lipiden und DNA-Basen abreagieren [17;185;246;316;317]. Die Gesamtmenge an oxidierten DNA-Basen, die täglich im menschlichen Organismus entsteht, wurde auf ca. 11.500 oxidierte Basen pro Zelle geschätzt [318]. Diese können langfristig zur Krebsentstehung beitragen. Zusätzlich können endogene Estrogene (E2) über Catecholestrogene (2- und 4-OH-E2) zu Quinonen aktiviert werden, die mit DNA-Basen Addukte formen [17]. HNE, ein α,β -ungesättigtes Aldehyd aus dem Prozess der Lipidperoxydation, kann zudem Etheno- und Propeno-Addukte induzieren [316;319]. PAKs wie z. B. B(a)P sind weit verbreitete Umweltkontaminanten, welche als Beiprodukte in Verbrennungsprozessen oder während der Lebensmittel-Zubereitung entstehen [320]. Durch biologische Aktivierung des B(a)P entstehen einerseits durch CYP-Aktivität BPDE, welches über Addukt-Bildung mit DNA-Basen DNA-Schäden und Mutationen hervorruft [320] und andererseits durch CYP, Peroxidasen und UV-Licht B(a)P-Quinone. Beide, Catecholestrogen-

Quinone und B(a)P-Quinone, hier durch die Modellschubstanz Menadion vertreten, sind hoch reaktive Verbindungen, die sich dem 1-Elektron-Redoxcycling mit ihrem korrespondierenden Semiquinon-Radikal unterziehen können, wobei wiederum ROS entstehen [17;246;317].

Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass entgegen früherer *in vitro*-Experimente [321;322] E2 und 4-OH-E2 (0,01-1 µM; 2 h, 37°C) in beiden Mammazelllinien keine DNA-Schäden induzierten.

H₂O₂ wurde in der Vergangenheit in zahlreichen Untersuchungen als Modell zur Induktion von oxidativen Stress eingesetzt [201;323]. Zur Wirkung des HNE in Bezug auf die Induktion von DNA-Schäden liegen z. Z. nur wenige Informationen vor. Das genotoxische Potential in Kolonzellen [231;324] sowie via Adduktbildung hervorgerufene Schäden im *TP53* Gen sind bereits beschrieben [325;326]. Die Mammazellmodelle wiesen nach Behandlung mit 0-150 µM H₂O₂ (5 min, 4°C) dosisabhängige DNA-Schäden auf. Im physiologischen Konzentrationsbereich von 2,5 bis 16 µM [327;328] zeigten die tumorigenen MCF-7 Zellen signifikant höhere TI-Werte als Maß für die DNA-Schadensrate im Vergleich zu den MCF-10A Zellen, was für hohe H₂O₂-Konzentrationen von über 37,5 µM nicht mehr beobachtet werden konnte (TI = 68 ± 6,4 % in MCF-10A und TI = 62 ± 2,3 % in MCF-7 bei 150 µM H₂O₂). HNE (0-150 µM) induzierte in den untersuchten Mammazellen konzentrationsabhängige DNA-Schäden, die nach Behandlung mit 150 µM HNE für die MCF-7 Zellen bei TI = 32 ± 6,0 % und für die MCF-10A Zellen bei TI = 16 ± 4,7 % lagen. Wieder reagierten die transformierten Zellen sensitiver auf die schädigende Noxe als die nicht-transformierten Zellen. Sensitivitätsunterschiede gegenüber H₂O₂ und HNE, basierend auf dem Transformationsgrad der Zellen, wurden auch in Kolonzellen detektiert [231;264;329]. Dabei wurden in Tumorzellen durch beide Karzinogene ebenfalls höhere DNA-Schäden induziert als in Primärzellen.

B(a)P, ein Vertreter der PAK, wurde bisher selten als DNA-schädigendes Agens in Chemoprotektionsstudien eingesetzt. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass B(a)P ausschließlich in den MCF-7 Zellen die DNA-Integrität herabsetzte. Signifikante DNA-Schäden wurden durch 100 µM B(a)P hervorgerufen, eine Konzentration, die die Exposition durch die Ernährung (600-1000 ng/Tag) um das 100-fache übersteigt [330;331]. Gegenüber dem über Hydroxylierungsreaktionen aus B(a)P gebildeten reaktiven und genotoxischen Metaboliten BPDE [332;333] zeigten die tumorigenen MCF-7 Zellen wiederum eine signifikant höhere DNA-Schadensrate als die MCF-10A Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten bei Kolonzellen Primärzellen eine höhere Sensitivität als Adenomzellen [334].

Menadion induziert Einzel- und Doppelstrangbrüche und ist ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Bedeutung von Quinonen bei der Induktion von DNA-Schäden [335]. In dieser Arbeit wurde es als Modellschubstanz für elektrophile quinoide Verbindungen, die z. B. im Metabolismus der Estrogene und des B(a)P entstehen, verwendet. In beiden Mammazellen wurden DNA-Schäden induziert, die mit steigender Konzentration zunahmen. Der Vergleich der Zelllinien ergab eine signifikant höhere Schadensrate in MCF-7 Zellen als in MCF-10A Zellen.

Die bei allen hier getesteten Noxen (Ausnahme stellen die endogenen Estrogene dar) auftretende höhere Empfindlichkeit der Krebszellen MCF-7 im Vergleich zu den nicht-tumorigenen MCF-10A Zellen warf die Frage nach den Hintergründen auf. Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte auf eine möglicherweise reduzierte Reparaturkapazität der MCF-7 Zellen zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass ER(-) Mammazellen eine verbesserte Reparaturkapazität aufweisen als ER(+) Mammazellen [287]. Die Untersuchungen zur differentiellen Genexpression erlaubten Aussagen über die Expression der für die Beseitigung oxidativer Stress- und „bulky adduct“-induzierter DNA-Schäden relevanter Reparaturgene (*XRCC*, *ERCC*). Diese waren in MCF-10A Zellen höher exprimiert als in MCF-7 Zellen.

In weiterführenden Untersuchungen wurde die Reparaturreffizienz der MCF-7 Tumorzellen unter Verwendung von H₂O₂ als schädigendes Agens ermittelt. Dabei wurde die Persistenz der im Comet Assay gemessenen Schäden erfasst. Die durch H₂O₂ induzierten DNA-Schäden wurden innerhalb von 30 min signifikant repariert, wobei jedoch die Reparatur über den gesamten beobachteten Zeitraum von 120 min unvollständig blieb. Dieser Verlauf der Reparatur H₂O₂-induzierter DNA-Schäden entspricht dem, der bereits für Kolonzellen, sowohl primär als auch transformiert, beschrieben wurde [264]. Daraus schlussfolgernd konnte eine reduzierte Reparaturkapazität als alleinige Ursache für die erhöhte Sensitivität der MCF-7 Zellen ausgeschlossen werden.

Eine höhere Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Agenzien ist unter anderem auch von zelltypspezifischen Unterschieden in den GSH-Konzentrationen und den jeweiligen Expressionsmustern und Aktivitäten der diese Substanzen entgiftenden Phase II-Enzyme wie GST und NQO1 abhängig. So konnten Glaab *et al.* [336] und Janzowski *et al.* [337] für α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen eine GSH-Depletion in V79-, Caco2- und primären Kolonzellen und Mobley *et al.* [338] für Estrogene in MCF-7 Zellen nachweisen und zeigen, dass das Ausmaß der GSH-Depletion mit der zelltypspezifisch genotoxischen Wirkung der jeweiligen Substanzen verbunden war. Für HNE wurde bereits der Zusammenhang zwischen genotoxischem Potential und GST-Enzymausstattung sowie Aktivität in Kolonzellen [231]

und für Estradiol der zwischen 8-oxo-dG und NQO1-Aktivität in Brustzellen gezeigt [253]. Ob die differenzielle Enzymausstattung für die Sensitivitätsunterschiede der Brustzellen verantwortlich war, wird nachfolgend diskutiert.

5.2 EXPRESSIONSMUSTER ENDOGENER SCHUTZSYSTEME IN NORMALEN UND TRANSFORMIERTEN MAMMAZELLEN

Das Ziel der Chemoprävention ist die Verhinderung der Initiation normaler Zellen sowie die Vermeidung der Progression initiiertter Zellen zu transformierten Zellen. Zu den wesentlichen Strategien der Chemoprävention gehören die Hemmung aktivierender und die Induktion detoxifizierender Enzymsysteme sowie die Verbesserung der DNA-Reparatur [84]. Für Chemopräventionsstudien sind primäre bzw. prämaligne Zellen den etablierten Tumorzelllinien vorzuziehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vergleichend sowohl prämaligne (MCF-10A) als auch transformierte Mammazellen (MCF-7) untersucht. Um die Hypothese einer für die Sensitivitätsunterschiede der Mammazellen gegenüber Phytoestrogenen sowie Brustkrebs-Risikofaktoren zugrunde liegenden unterschiedlichen Expression endogener Schutzsysteme zu untermauern, wurde zunächst die Expression von Genen ermittelt, die im Fremdstoffmetabolismus bzw. in Pathways des oxidativen Stresses und der Toxizität involvierte Enzyme kodieren. Die Aktivitäten toxischer sowie nicht-toxischer Substanzen in den Zielzellen sind abhängig von der Expression dieser Enzymsysteme, die modulierbar sind und die zelluläre Entgiftungsleistung beeinflussen.

Für einen ersten Überblick wurde eine cDNA-Array Technik etabliert, die es ermöglichte, 192 Gene gleichzeitig zu erfassen (**Kapitel 4.2.1**). Die Auswertung der Basalexpression ergab signifikante Unterschiede zwischen den MCF-10A und MCF-7 Zellen in 30 Genen der Biotransformation und in 23 Genen, die mit oxidativem Stress und Toxizität assoziiert sind. Wesentliche zelltyp-spezifische Unterschiede traten in der Expression von DNA-Reparaturgenen der Gruppen *XRCC* und *ERCC* auf, mit höherer Basalexpression in MCF-10A Zellen wie unter 5.1.2 diskutiert. Hinsichtlich bestimmter detoxifizierender Phase II- (GSTs, SULTs, UGTs) und Phase III-Enzyme (ABC-Transportproteine) zeigten die transformierten MCF-7 Zellen aber eine höhere Basalexpression. Bei den oxidativen Stress-assoziierten Genen wie z. B. GPX1, MnSOD, MTs und MGSTs wurde dagegen eine geringere Expression als in MCF-10A beobachtet. Da die meisten hier untersuchten genotoxischen Agenzien über die Induktion von oxidativen Stress DNA-Schäden hervorrufen, könnte dies ein weiterer Erklärungsansatz für die erhöhte Empfindlichkeit der MCF-7 Zellen gegenüber den Risikosubstanzen sein.

Im Metabolismus der Brustkrebs-relevanten Karzinogene (HNE, BPDE, Catechol-estrogen- und B(a)P-Quinone) sind die GSTs und die NQO1 bedeutende detoxifizierende Enzymfamilien, die in dieser Arbeit näher charakterisiert wurden (**Kapitel 4.2.2 und 4.2.3**).

Das in der Literatur für die Brust beschriebene GST-Muster, bei der GST π das hauptsächlich exprimierte Isoenzym darstellt und GST α und μ in geringerem Ausmaß vorhanden sind [221;339], wurde nur in den MCF-10A Zellen bestätigt. Die Ergebnisse zeigten unterschiedliche Expressionsmuster der GSTs in beiden Mammazelllinien mit höheren GST-Gesamtspiegeln in nicht-transformierten MCF-10A, speziell in der Expression der hGSTA4-4 und hGSTP1-1. Hohe hGSTP1-1 Proteingehalte wiesen die MCF-10A auf. Diese lagen in den primär-ähnlichen MCF-10A Zellen mit 532 ± 251 ng/ 10^6 Zellen ca. 174 % über denen primärer Kolonzellen (194 ± 90 ng/ 10^6 Zellen) und ca. 34 % unter denen maligner Kolonzellen, die eine konstitutionell höhere hGSTP1-1 Expression aufweisen (HT29: 805 ± 252 ng/ 10^6 Zellen) [219]. In den MCF-7 Zellen konnte dagegen kein hGSTP1-1 Protein detektiert werden, obwohl *hGSTP1* mRNA exprimiert war. Die mRNA-Gehalte waren allerdings 66.000-fach geringer als in MCF-10A Zellen. Die GST α (GSTA1/2) war in beiden Mammazelllinien nur marginal nachweisbar. Die Isoenzyme der GST-Klasse μ (GSTM1-1, GSTM2-2) waren in beiden Zelllinien auch nur marginal bzw. gar nicht exprimiert.

Die hGSTP1-1 stellt in Brustzellen des gesunden Gewebes sowie von Tumoren das am häufigsten vorhandene GST-Isoenzym dar. Häufig wurde berichtet, dass ER(+) Tumoren und die Zelllinie MCF-7 kein π -Protein exprimieren [340;341]. Es gibt Informationen, die eine inverse Korrelation zwischen der *hGSTP1* Genexpression und den ER-Spiegeln in Brustkrebs-Zelllinien beschreiben [342;343]. Weil sich die Transkriptionsraten zwischen ER(+) MCF-7 und ER(-) Mammazellen jedoch nicht unterschieden [342;343], wurde geschlossen, dass die hGSTP1-1 Proteinexpression posttranskriptionell reguliert ist. Eine mögliche Ursache für die marginale bzw. fehlende hGSTP1-1 Proteinexpression in MCF-7 Zellen ist die geringe mRNA-Stabilität. Literaturdaten zeigen, dass die *hGSTP1* mRNA in MCF-7 undetektierbar ist, während die Halbwertszeit der *hGSTP1* mRNA in ER(-) Brustkrebszellen 12-18 h beträgt [342]. Weitere mögliche Mechanismen, die die hGSTP1-1 Expression in MCF-7 Zellen beeinflussen können, sind einerseits die Hypermethylierung der GC-reichen Regionen (SP-1) innerhalb des *hGSTP1* Promotors [344] und andererseits der Proteasom-abhängige hGSTP1-1 Proteinumsatz [345]. Im letzteren Falle könnte eine erhöhte Proteasom-Aktivität in den MCF-7 Zellen im Vergleich zu den MCF-10A Zellen für die Unterschiede in der hGSTP1-1 Basalexpression zwischen beiden Zelllinien verantwortlich sein.

Die erhöhte GST-Gesamtaktivität der dysplastischen MCF-10A Zellen, welche etwa 100-fach höher war als die durchschnittliche Aktivität der MCF-7 Zellen, lässt sich über die Expressionshöhe der einzelnen Isoenzyme und deren Substratspezifität erklären. So besitzen außer der GST θ alle GST-Isoenzyme eine Substrat-Affinität gegenüber CDNB. Allerdings unterscheiden sich die spezifischen Aktivitäten der Isoenzyme teilweise stark voneinander. So weisen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten GSTs hGSTA4-4 nur eine sehr geringe Affinität (12,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein), hGSTA1-1, hGSTA2-2 und hGSTP1-1 moderate Aktivitäten (80-100 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) und hGSTM1-1 und hGSTM2-2 hohe Aktivitäten (160-280 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) gegenüber CDNB auf [217;226]. Das Fehlen nennenswerter Mengen an hGSTP1-1 Protein und die schwache Expression der GST μ und α Klassen in MCF-7 Zellen, welche eine hohe Substratspezifität gegenüber CDNB besitzen, unterstreichen die niedrigere GST-Aktivität in MCF-7 Zellen im Vergleich zu MCF-10A Zellen. Die eigenen Ergebnisse finden Bestätigung durch frühere Untersuchungen von Fields *et al.*, der ebenfalls eine geringe GST-Gesamtaktivität in MCF-7 Zellen beobachtete (<10 nmol/min/mg Protein) [340]. Trotz der großen Unterschiede im GST-Expressionsmuster und der daraus resultierenden GST-Aktivität besaßen beide Zelllinien vergleichbare Konzentrationen an intrazellulärem GSH, dem Kofaktor der GST-Isoenzyme.

Bezüglich der GSTM1, T1 und P1 existieren Polymorphismen in der Bevölkerung, die mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert sind. Dazu zählen der GSTM1*0 Polymorphismus, der bei 50 % der Europäerinnen auftritt, und der T1*0 Polymorphismus, der bei 10-25 % der Europäerinnen vorkommt [289;290]. Das Auftreten vom GSTP1 (Val/Val) Phänotyp führte in epidemiologischen Studien zu kontroversen Ergebnissen. Helzlsouer *et al.* beschrieb eine tendenzielle Erhöhung des Risikos für Brustkrebs, Mitrunen *et al.* dagegen eine tendenzielle Protektion gegen Brustkrebs [289;290].

Das Phase II-Enzym hNQO1-1 war in beiden Mammazelllinien präsent, wobei tumorigenen MCF-7 Zellen 3-fach höhere mRNA-Gehalte als dysplastische MCF-10A Zellen aufwiesen. Dies konnte aufgrund der methodischen Limitierung (Fehlen eines geeigneten Standardproteins) auf Proteinebene nicht quantifiziert werden, war aber visuell an der Bandenintensität sichtbar. Dieser Unterschied wurde auf der funktionellen Ebene der NQO1-Aktivität detektiert. Immunozytochemische Untersuchungen bestätigten, dass die NQO1 im Tumorgewebe der Brust höher exprimiert ist als im korrespondierenden gesunden Gewebe [239;240]. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch bisher ungeklärt.

Die Untersuchungen ergaben eine Variation in der Expression von Enzymsystemen der Biotransformation und des oxidativen Stresses in den Mammazellen unterschiedlichen

Transformationsgrades. Das Ausmaß der Expression protektiver Enzymsysteme ist demzufolge abhängig vom Zelltyp. Die Enzymausstattung bestimmt das zelluläre Potential zur Chemoprotektion und ist entscheidend für die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber potenziellen Risikofaktoren. Das Vorhandensein von Polymorphismen sowie das Ausmaß der Genexpression scheinen gemeinsam entscheidend für die höhere Empfindlichkeit der MCF-7 Zellen gegenüber Risikofaktoren zu sein, die Substrate für die hier betrachteten Enzymsysteme darstellen.

5.3 EINFLUß VON PHYTOESTROGENEN AUF DIE EXPRESSION VON FREMDSTOFFMETABOLISMUS- BZW. OXIDATIVER STRESS-ASSOZIIERTEN ENZYMSYSTEMEN IN MAMMAZELLEN

Es ist bekannt, dass Ernährung und Lebensstil die Entwicklung von Brusttumoren stark beeinflussen. Epidemiologische Daten weisen darauf hin, dass die hohe Aufnahme von Phytoestrogenen mit einer verminderten Inzidenz des Mammakarzinoms assoziiert ist [77]. In diesem Zusammenhang werden unterschiedliche chemopräventive Wirkmechanismen der Risikoreduktion diskutiert. Von besonderer Bedeutung ist die Induktion detoxifizierender bzw. oxidativer Stress-assoziiierter Enzymsysteme. Eine verbesserte Entgiftung und/oder schnellere Ausscheidung ultimer Karzinogene resultiert in einem inhibitorischen Effekt auf die Krebsinitiation und einem möglicherweise verminderten Krebsrisiko [211].

5.3.1 DIFFERENZIELLE GENEXPRESSION IN BRUSTZELLEN – cDNA-ARRAY SCREENING

Für die Genexpressionsversuche (**Kapitel 4.3.1**) wurde GEN als das wirksamste Phytoestrogen ausgewählt. Um die Phytoestrogen-spezifischen Modulationen in den beiden Mammazelllinien zu ermitteln, wurde als Referenzsubstanz E2 mitgeführt. Dabei zeigte sich, dass in den dysplastischen MCF-10A Zellen insgesamt weniger Gene sowohl durch GEN als auch durch E2 signifikant moduliert wurden.

Die Inkubation dysplastischer MCF-10A Zellen mit dem Isoflavon (1 μ M, 10 μ M) führte zu einer signifikanten Hochregulation von detoxifizierenden Phase II-Enzymsystemen der Gruppen GST (1,7-fach), SULT (7-fach) und UGT (1,8-fach) und von Reparaturgenen (*XRCC2*, 2,5-3-fach). Diese Schutzsysteme sind in die Entgiftung reaktiver Estrogen-Metabolite und exogener Karzinogene sowie in die Basenexzisions- und Nukleotidexzisionsreparatur involviert [216;346;347]. GSTs entgiften durch die Konjugation mit GSH elektrophile Karzinogene und sind zusätzlich am ROS-Stoffwechsel beteiligt. Das Isoenzym hGSTP1-1 zeigt Substratspezifität für Catecholestrogen-Quinone [348], BPDE und HNE [224;227] und verhindert somit die Induktion von DNA-Schäden durch Adduktbildung

bzw. ROS. SULTs katalysieren die Übertragung von Sulfonyl-Gruppen vom Kosubstrat 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat auf nukleophile Substrate, zu denen viele Xenobiotika und Hormone zählen [213]. Im Hormonstoffwechsel sind die Isoenzyme SULT1A1 und SULT1B1 an der Entgiftung endogener Estrogene wie E2 und Catecholestrogene beteiligt [347;349]. Die UGTs, welche Glucuronsäuren auf lipophile Substrate übertragen und die entstandenen Glucuronide somit renal und biliär ausscheidbar machen, zeigen ebenfalls Aktivität in der Konjugation von Catecholestrogenen (UGT1A1, UGT2B) [347;349]. In den tumorigenen MCF-7 Zellen führte die GEN-Behandlung zu einer Erniedrigung in der Genexpression einzelner Isoformen der protektiven Phase II-Enzymsysteme GST (1,5-fach), SULT (1,6-fach) und UGT (1,4-2-fach). Als Konsequenz ist eine erhöhte Exposition der Zellen mit genotoxischen Agenzien wie den elektrophilen Catecholestrogenen und den daraus resultierenden ROS möglich.

Andererseits spielen die Enzymsysteme SULT und UGT auch im Metabolismus der Phytoestrogene eine Rolle und vermindern so ihre Bioverfügbarkeit in den Zellen. Die Konjugation mit Glucuronsäure bzw. Sulfat wird als der Hauptentgiftungsweg für die Isoflavone angesehen. Die für die Glucuronidierung und Sulfatierung der Isoflavone und ihrer Metabolite *in vitro* verantwortlichen Isoenzyme sind UGT1A1, 1A4, 1A6, 1A7, 1A9, 1A10 und SULT1A1, 1A3, 1E1, 2A1 [350;351].

Die Genexpression der Metallothioneine, Enzyme, die gegen Schwermetallionen- und oxidativen Stress-induzierte DNA-Schäden schützend wirken [352;353], wurden in MCF-7 Tumorzellen durch GEN unterdrückt (2-fach), wodurch ebenfalls die erhöhte Anfälligkeit für oxidative DNA-Schäden erklärt werden kann. Es besteht zudem eine positive Korrelation zwischen der Metallothionein-Expression und der Expression von Ki-67 und PCNA Antigen, welche als Proliferationsmarker betrachtet werden [352]. Demzufolge könnte die Herunterregulation der Metallothioneine durch GEN in MCF-7 auch ein Zeichen einer verminderten Proliferation darstellen. In den eigenen Untersuchungen zur Modulation des Zellwachstums war nach 48-stündiger Behandlung bereits bei GEN-Konzentrationen von $>1 \mu\text{M}$ eine geringe tendenzielle Reduktion der DNA-Syntheserate (BrdU) erkennbar. Die verminderte Genexpression (3,8-fach) des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Bcl-w), wie in MCF-10A Zellen detektiert, könnte einen möglichen Mechanismus für die durch GEN induzierte Proliferationshemmung in frühen Stadien der Karzinogenese darstellen. Dass Polyphenole, zu denen auch GEN gehört, Apoptose induzieren, wurde vielfach in *in vitro*-Studien nachgewiesen. Es wurde eine Hochregulation des proapoptotischen Bax beschrieben und eine gleichzeitige Herabregulation von Bcl-2 und Bcl-x [312;354]. Dagegen konnte

dieser Pathway in den MCF-7 Zellen durch physiologische GEN-Konzentrationen nicht induziert werden [311].

E2, welches als Referenzsubstanz mitgeführt wurde, nahm auf die Genexpression der MCF-10A Zellen kaum Einfluss, modulierte aber wichtige Enzymsysteme in den MCF-7 Zellen. Die Katalase, die H_2O_2 zu H_2O und O_2 katalysiert, wurde herabgesetzt, was zu einer erhöhten Exposition mit ROS führt. ABC-Transportproteine, die für den Abtransport von Xenobiotika und endogenen zytotoxischen Verbindungen aus der Zelle verantwortlich sind, wurden um das 1,6-2,3-fache herunterreguliert.

Die Expression protektiver Enzymsysteme sowie deren Modulation durch Phytoestrogene bestimmen das Brustkrebsrisiko. GEN besitzt die Fähigkeit, Phase II- und DNA-Reparaturenzyme in nicht-transformierten Mammazellen zu induzieren, welche einen Schutz vor elektrophilen Karzinogenen und Produkten des oxidativen Stresses in frühen Stadien der Tumorigenese darstellen. Neben der Wirkung als „blocking agent“ wirkt GEN in initiierten Zellen auch als „suppressing agent“, indem es durch die Modulation Apoptose- und Proliferations-assoziiierter Gene das Wachstum prämaligner Mammazellen inhibiert und somit die Tumorprogression verhindert.

5.3.2 MODULATION VON PHASE II-ENZYSYSTEMEN IN MAMMAZELLINIEN

5.3.2.1 GENISTEIN INDUZIERT DAS GLUTATHION/GLUTATHION S-TRANSFERASE-SYSTEM

GEN beeinflusst den Karzinogeneseprozess in allen drei Stadien – in der Initiation, der Promotion und der Progression. Bekannte Wirkmechanismen von GEN beinhalten die Hemmung von Tyrosinkinasen, Hemmung des Zellwachstums durch Zellzyklus-Regulation, Induktion der Differenzierung sowie Apoptose und Hemmung der Angiogenese und Metastasierung [360]. Über die induzierende Wirkung von Phytoestrogenen auf die GST-Aktivität ist allerdings bisher wenig bekannt und die bisherigen Ergebnisse sind sehr widersprüchlich [361-363]. Zudem gibt es bisher keine Informationen darüber, welche GST-Isoenzyme im Brustgewebe für diese Effekte verantwortlich sind und welche Konsequenzen die Induktion auf die Chemosensitivität der Mammazellen gegenüber potenziellen Risikofaktoren hat. Deshalb war neben der Bestimmung des GST-Expressionsmuster auch die Untersuchung der Modulation der GST-Expression durch Phytoestrogene in den Mammazelllinien MCF-10A und MCF-7 Gegenstand der Arbeit (**Kapitel 4.3.2**).

Die Daten zeigten in den nicht-tumorigenen MCF-10A Zellen eine konzentrationsabhängige Steigerung der intrazellulären GSH-Konzentrationen und der GST-Aktivität infolge einer 48-stündigen GEN-Behandlung. Letztere war verbunden mit einer

Hochregulation der hGSTP1 Gen- und Proteinexpression. Es wurde ein zeitabhängiger signifikanter Anstieg der *hGSTP1* mRNA (ca. 2-fach) mit einem Induktionsmaximum nach 48 h Inkubation mit 30 µM GEN detektiert, welcher in etwa der Induktion des hGSTP1-1 Proteins (ca. 3-fach) entspricht. Obwohl die *hGSTA4* mRNA Expression durch GEN herunterreguliert wurde, fand keine Modulation des entsprechenden Proteins statt. Eine mögliche Erklärung für diese Effekte könnte in einer Verminderung der mRNA-Stabilität liegen. Diese Hypothese wurde durch Untersuchungen zur Butyrat-vermittelten Modulation der hGSTT1-1 Expression in Kolonzellen bestätigt. Trotz der gesteigerten *hGSTT1* mRNA Expression wurde die Proteinexpression aufgrund der verminderten mRNA-Stabilität nicht moduliert [364]. Die hohe Korrelation zwischen der hGSTP1-1 Proteinexpression und der GST-Aktivität zeigt, dass die Induktion des hGSTP1-1 Proteins wahrscheinlich hauptverantwortlich für den Anstieg der GST-Aktivität in MCF-10A Zellen ist. Dennoch kann eine zusätzliche Induktion anderer GST-Isoenzyme (A1/2, M1), welche ebenfalls eine Affinität zu CDNB aufweisen und damit zur Aktivitätssteigerung beitragen können, nicht ausgeschlossen werden.

In den tumorigenen MCF-7 Zellen hatte GEN keine modulierende Wirkung auf die GSH-Spiegel, die GST-Aktivität sowie die Expression der hier untersuchten Isoenzyme hGSTA4-4 und hGSTP1-1. Die Induktion der intrazellulären GSH-Konzentration und der GST-Aktivität durch EQU in MCF-7 Zellen konnte nicht durch die in dieser Arbeit untersuchten GST-Isoenzyme hGSTA4-4 und hGSTP1-1 erklärt werden. Die Induktion anderer GST-Isoenzyme, die ebenso zur Aktivitätssteigerung beitragen können, kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Erhöhung des GST-Status in primären Mammazellen oder Zellen im frühen Stadium der Transformation infolge der GEN-Behandlung stellt einen protektiven Mechanismus dar, um schädigende Einflüsse karzinogener Substanzen zu vermindern. Unterstützung dieser Hypothese kommt aus zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien, die ernährungsrelevante Substanzen wie z. B. Flavonoide, u. a. GEN [230;362], Isothiocyanate und phenolische Antioxidanzien [365;366], das Fermentationsprodukt Butyrat [220;231;324] und Kaffee [367] hinsichtlich ihrer chemoprotektiven Wirkungen untersuchten. In diesem Zusammenhang scheint der Ernährungsstatus ein entscheidender Faktor nicht nur in der Erzeugung sondern auch in der Verminderung Brustkrebs-relevanter toxischer Metabolite zu sein [368]. Substanzen von toxikologischer Relevanz in der Mammakarzinogenese schließen mutagene 4-Hydroxy-Alkenale (HNE), welche während des physiologischen Prozesses der Lipidperoxidation entstehen [316], und PAKs (B(a)P, BPDE), welche in unvollständig ablaufenden Verbrennungsprozessen wie der Lebensmittel-Erhitzung entstehen [320], ein.

Sowohl die hGSTP1-1 als auch die hGSTA4-4 schützen vor Produkten des oxidativen Stresses und unterbinden die Entstehung von DNA-Addukten. Sie spielen somit bei der Protektion vor endogenen und exogenen Risikofaktoren der Karzinogenese eine wichtige Rolle [224;225].

Andererseits wird die Überexpression von hGSTP1 in den meisten Tumorgeweben als Tumormarker diskutiert [369]. Im Fall von Tumorzellen kann ein Anstieg der GST-Aktivität zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in der Krebstherapie führen und damit das Überleben transformierter Zellen begünstigen. Bei Brusttumoren muß man bezüglich der Chemoresistenz zwischen ER(+) und ER(-) Tumoren unterscheiden. Wie bereits beschrieben ist die hGSTP1-1 Expression von der ER Expression abhängig. ER(+) Brusttumore, die kein hGSTP1-1 exprimieren, zeigen bezüglich der Therapie eine bessere Prognose als ER(-), hGSTP1-1 exprimierende Tumore.

5.3.2.2 GENISTEIN INDUZIERT DAS NQO1 ENZYMSYSTEM

Neben den GSTs ist die NQO1 ein weiteres wichtiges protektives Enzymsystem in Brustzellen. Die NQO1-Induktion u. a. durch Phytoestrogene in verschiedenen Zellsystemen wie Kolon und Leber wurde bereits beschrieben [252;370]. Über die induzierende Wirkung auf die NQO1-Aktivität in Brustzellen ist allerdings nur wenig bekannt [253]. In den bisherigen Studien wurden zudem ausschließlich etablierte Krebszelllinien verwendet, in denen eine Erhöhung der Phase II-Enzyme häufig mit einer Chemoresistenz verbunden ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die potenziell induzierende Wirkung der Isoflavone GEN und EQU und des Lignans ENL an nicht-transformierten Brustzellen (MCF-10A) untersucht und mit der Aktivität in den Tumorzellen MCF-7 verglichen werden, um somit das chemoprotektive Potential besser bewerten zu können (**Kapitel 4.3.3**).

Die Daten zeigten, dass GEN in primär-ähnlichen MCF-10A Zellen die *hNQO1* mRNA Expression im Gegensatz zu den tumorigenen MCF-7 Zellen induzierte. Es wurde ein zeitabhängiger signifikanter Anstieg der *hNQO1* mRNA durch 30 µM GEN mit einem Induktionsmaximum nach 24 h (ca. 3-fach) detektiert. Die transkriptionelle Induktion war verbunden mit einem vergleichbaren Anstieg in der Proteinexpression und der Enzymaktivität. Die nicht-modulierbare NQO1-Aktivität in den MCF-7 Tumorzellen resultiert aus dem Ausbleiben einer Transkriptionsinduktion. Allerdings beruhen die Unterschiede in der Transkription zwischen beiden Zelllinien nicht auf Veränderungen in der Promotorregion des Gens, wie Begleiter und Lange [235] diskutierten. Die beobachteten Transkriptionsvariationen basieren wahrscheinlich eher auf sogenannten regulatorischen „upstream“-Faktoren wie z. B. Veränderungen in der Induktion von Transkriptionsfaktoren

wie Jun, Nrf, Maf, Fos und Fra oder Veränderungen in Signaltransduktionswegen [243;255]. Tumorgewebe weisen ausserdem eine konstitutionell erhöhte hNQO1-1 Expression auf [239;240], so dass eine weitere Induktion erschwert ist.

EQU und ENL modulierten ebenfalls das NQO1-Enzymsystem in nicht-transformierten Mammaepithelzellen, wenn auch viel schwächer als GEN. EQU führte zu einer konzentrationsabhängigen Herunterregulation des Proteins in MCF-10A, zeigte aber keinen Einfluß auf die Enzymaktivität. Durch die Inkubation mit ENL konnte in diesen Zellen die NQO1-Aktivität induziert werden, wie auch andere Studien bewiesen haben [252]. Die Proteinexpression wurde aber nicht moduliert. In MCF-7 Zellen wurde das Phase II-Enzymsystem durch keine der Testsubstanzen moduliert.

Eine Konsequenz der hNQO1 Induktion in primären Brustzellen oder Zellen in frühen Stadien der Transformation stellt die Protektion gegenüber schädigenden Einflüssen karzinogener Verbindungen dar. Unterstützung findet diese Hypothese in zahlreichen Chemopräventionsstudien. Phytoestrogene (GEN, Biochanin A, ENL, Coumestrol) sowie synthetische Antiöstrogene (Hydroxytamoxifen, ICI-182.780) induzierten die NQO1 in verschiedenen Zellsystemen (Kolonzellen, Brustzellen) und boten einen Schutz vor E2-induzierten DNA-Schäden [252;253;321]. Andere Nahrungsinhaltsstoffe wie Flavonoide, Indole und Isothiocyanate zeigten ebenfalls protektive Wirkungen *in vitro* [248;251]. Auf diesen Kenntnissen basierend wird der Ernährung in Bezug auf die Protektion der Brustkrebsentwicklung eine große Bedeutung beigemessen. Substanzen von toxikologischer Relevanz stellen die endogenen Östrogene aber auch Umweltfaktoren wie die PAKs dar. Innerhalb ihres Metabolismus entstehen aus ihnen hoch reaktive Quinone, die einerseits über die Semiquinon-Bildung ROS erzeugen und andererseits DNA-Addukte induzieren [17;322;371]. Die Exposition epithelialer Mammazellen mit beiden Substanzklassen (E2, B(a)P) hat gezeigt, dass diese die Transformation normaler Zellen fördern [372;373].

Die Beobachtungen der Induktion der Phase II-Enzymsysteme GST und NQO1 in dysplastischen MCF-10A Zellen durch Phytoestrogene geben Hinweise auf eine Erhöhung des zellulären Schutzes primärer bzw. initiierten Zellen gegenüber elektrophilen Karzinogenen und Produkten des oxidativen Stresses infolge der Erhöhung der reduktiven Kapazität der Zelle. Damit verbunden ist eine reduzierte Wahrscheinlichkeit der Brustkrebs-Initiation und Progression. Eine lebenslange Induktion zellulärer Schutzsysteme in primären Zellen durch eine Soja-reiche Ernährung stellt somit einen Beitrag zur Prävention der Mammakarzinogenese dar.

5.3.2.3 MÖGLICHE REGULATIONSMECHANISMEN DER PHASE II-ENZYMEXPRESSION

Die eigenen Untersuchungen zeigten eine GEN-vermittelte Induktion der mRNA-Expression der Phase II-Enzyme GSTs und NQO1. Bisher ist allerdings wenig über den exakten Mechanismus bekannt, der der Modulation der *hGSTP1*, *hGSTA4* und *hNQO1* mRNA-Expression durch phytoprotektive Verbindungen wie den Phytoestrogenen zugrunde liegt. Wichtige Mechanismen, die entscheidend sind für die Regulation einiger, aber nicht aller Phase II-Gene (einschließlich der GSTs und der NQO1) schliessen AP-1 Bindungsstellen und das Antioxidant Response Element (ARE), welche in der Promotorregion der Gene lokalisiert sind, ein [232;233;236]. Im Falle des *hNQO1* Gens ist die AP-1 Bindungsstelle in dem Antioxidant Response Element (ARE) enthalten.

Der regulatorische Mechanismus der Genexpression ist zudem von der induzierenden Substanz abhängig. Xia *et al.* konnten zeigen, dass synthetische Antioxidanzien (t-BHQ, BHA) die Regulation der *hGSTP1* Genexpression über AP-1 Bindungsstellen förderten aber die Signaltransduktion über NF- κ B hemmten, die vorrangig durch Oxidanzien wie H₂O₂ induziert wurde [234]. Surh bestätigte die Hemmung der NF- κ B Freisetzung und anschließende Translokation in den Zellkern auch für GEN [374], die durch die Hemmung der Akt-Kinase Kaskade vermittelt wurde [375]. Aufgrund dieser Kenntnisse gewann die AP-1 Bindungsstelle für die Phase II-Enzyminduktion immer mehr an Bedeutung und somit auch Transkriptionsfaktoren wie Nrf2 und Fos, welche den AP-1-Komplex durch Heterodimerisierung mit Jun und small Maf Proteinen bilden.

Phytoestrogene können die hier untersuchten Gene *hGSTA4*, *hGSTP1* und *hNQO1* über ER-abhängige und ER-unabhängige Signaltransduktionswege stimulieren [376], die in **Abbildung 5.1** zusammengefasst sind.

In ER(+) Zellen bilden die ER-Agonisten durch Bindung an den zytoplasmatischen Hormonrezeptor (ER β) einen Hormon-Rezeptor-Komplex, der direkt über die Bindung an Estrogen Responsive Element (ERE)-Bindungsstellen (z. B. innerhalb der Promotorregionen des AP-1 bildenden Transkriptionsfaktors *c-fos* oder im Falle der *hNQO1* innerhalb der ARE-Sequenz) die Transkription reguliert [321;379;380]. Bei der Bindung an EREs zeigen ER α und ER β gleiche Aktivierungsmuster unabhängig vom Liganden (Estrogene bzw. Antiestrogene). Es existieren jedoch Unterschiede an der AP-1 Bindungsstelle. Während ER α im Komplex sowohl mit Estrogenen als auch mit Antiestrogenen die Transkription aktiviert, agieren mit ER β -AP-1 die Antiestrogene als Transkriptionsaktivatoren und die Estrogene als Inhibitoren [377]. Aufgrund der hohen Affinität der Phytoestrogene zum ER β und der nicht aufgetretenen Enzyminduktion durch E2 könnte GEN über diesen Aktivierungsweg die

Expression der *hGSTP1* und *hNQO1* vermittelt haben. Beweise über den durch Phytoestrogen (GEN, Biochanin A) induzierten ER β -vermittelten Aktivierungsweg lieferten die Untersuchungen von Bianco *et al.* [253].

Weiterhin kann der aktivierte Rezeptorkomplex die transkriptionelle Aktivierung auch über AP-1 Enhancer Elements auslösen, indem er direkt mit den Mitgliedern des AP-1 Komplexes Jun, Fos und Nrf2 interagiert [222;377]. Ein dritter ER-vermittelter Mechanismus für die Induktion der Phase II-Enzyme ist die indirekte Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) wie extrazellulär regulierte Kinasen 1/2 (ERK1/2) und c-jun N-terminale Kinase (JNK), die ebenfalls in der Transkriptionsregulation über die AP-1 Bindungsstelle resultiert [381].

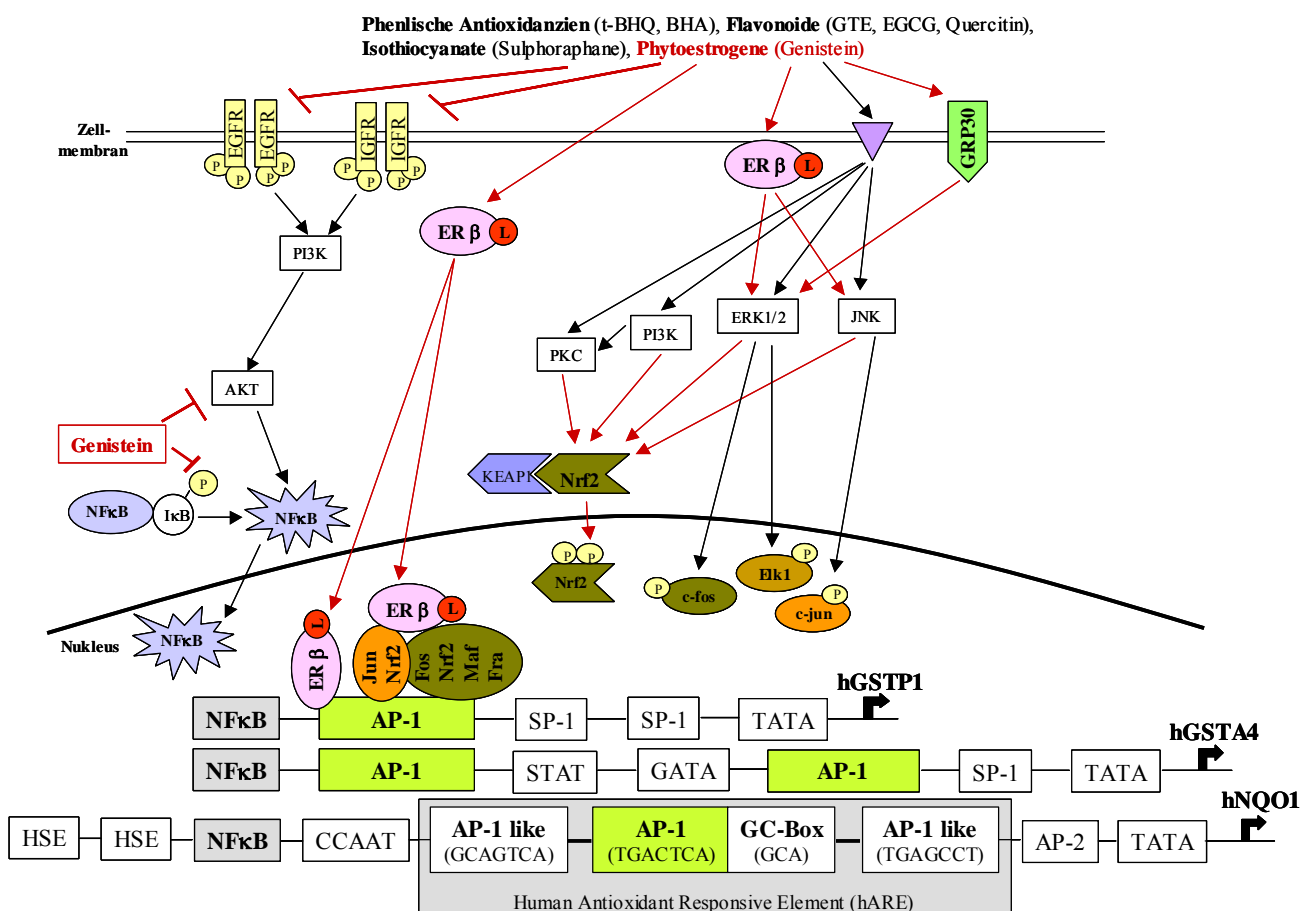


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Regulation der Genexpression und Induktion von *hGSTA4*, *hGSTP1* und *hNQO1* nach [216;253;255;321;374;375;377;378]

Rote Pfeile beschreiben die Aktivierungs-Pathways von GEN.

Die ER-unabhängige Genregulation wird für Phytoestrogene über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPR) vermittelt. Für GEN ist der Signalweg über den GPR30 beschrieben [378]. Durch Bindung an den membranständigen Rezeptor wird die Phosphorylierung der ERK1/2 induziert. Die MAPK Kaskade stellt somit einen bedeutenden ER-abhängigen und ER-

unabhängigen Signaltransduktionsweg zur Vermittlung der Phytoestrogen-Wirkung über AP-1 bzw. ARE bei der Genexpression von Phase II-Enzymen dar. Dieser und andere Kinase-vermittelte (Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Proteinkinase C (PKC)) Signaltransduktionswege für GST- und NQO1-Aktivierung sind bereits für zahlreiche chemoprotektive Substanzen wie phenolische Antioxidanzien (t-BHQ, BHA), Flavonoide (Quercetin, EGCG), Isothiocyanate (BITC, PEITC, Sulforaphan) und Butyrat beschrieben [231;382;383]. Die Aktivierung der Proteinkinasen resultiert in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wobei hier Nrf2, Fos und Jun als Bestandteile des AP-1 Komplexes eine bedeutende Rolle spielen [222;255;384;385]. Als Konsequenz aktivieren diese die *hGSTP1*, *hGSTA4* und *hNQO1* Transkription über Bindung an die AP-1 Bindungsstelle [216].

5.4 GENISTEIN WIRKT ANTIGENOTOXISCH GEGEN BRUSTKREBS-ASSOZIIERTE KARZINOGENE IN NICHT-TRANSFORMIERTEN BRUSTZELLEN

Die Induktion von Phase II-Enzymen, wie den GSTs und der NQO1, gilt als eine der möglichen Strategien in der Krebsprävention, die insbesondere für Individuen mit niedrigem Phase II-Enzym-Status von Relevanz zu sein scheint. Die inter-individuell sehr unterschiedliche Expression der GSTs scheint bei der Induzierbarkeit der Isoenzyme eine große Rolle zu spielen wie Studien von Lampe *et al.* für Individuen mit dem *GSTM1*0* Genotyp gezeigt haben [365]. Auch eine verringerte NQO-Aktivität aufgrund einer Punktmutation im *hNQO1* Gen macht die Träger anfälliger für die Tumorentstehung [241]. Die Konsequenz einer GST- und NQO1-Induktion in primären Brustzellen bzw. Zellen im frühen Stadium der Transformation besteht in der Verminderung schädigender Einflüsse durch potenzielle Karzinogene. Das Konzept der Chemoprotektion durch Phase II-Enzym-Induktion, speziell der GSTs, wurde bereits mit Oltipraz zur Prävention von Aflatoxin B₁-induziertem Leberkrebs in China praktiziert [386;387].

In der vorliegenden Arbeit wurden GEN, EQU und ENL als Vertreter der Phytoestrogene auf ihr mögliches Potential, Phase II-Enzyme zu induzieren, untersucht. Im Gegensatz zum synthetischen Abkömmling der Kreuziferen-Dithiolethionine Oltipraz stellen die Isoflavone und Lignane natürliche Substanzen dar, die in Lebensmitteln enthalten sind bzw. im Darm durch die bakterielle Tätigkeit entstehen. In den vorangegangenen Untersuchungen des GSH/GST- und NQO-Systems erwies sich GEN in den MCF-10A Zellen als effektivster Induktor dieser Phase II-Enzyme (**Kapitel 4.3.2 und 4.3.3**). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die Untersuchungen zur Chemoprotektion durchgeführt.

Bisher ist noch unklar, in welchem Umfang karzinogene Stoffe aus der Umwelt und dem endogenen Metabolismus an der Initiation von Brustkrebs beteiligt sind. Man geht allerdings davon aus, dass sowohl exogene als auch endogene Risikofaktoren zum Krebsgesamtrisiko beitragen. Zu Substanzen von toxikologischer Relevanz für die Brustkrebsentwicklung gehören einerseits endogene Risikofaktoren wie Produkte des oxidativen Stresses und Steroidhormone und andererseits exogene Risikofaktoren, die unter anderem in Verarbeitungsprozessen bei der Lebensmittelherstellung entstehen. Zu den oxidativen Stress-assoziierten Verbindungen zählen Aldehyde, 2-Alkenale und 4-Hydroxyalkenale, welche während des physiologischen Prozesses der Lipidperoxidation von Membranlipiden und Lipoproteinen entstehen. Ein Hauptvertreter dieser physiologisch relevanten Oxidationsprodukte ist HNE, eine biologisch hoch reaktive Substanz mit zytotoxischem, genotoxischem und mutagenem Potential [316;324;388]. Exogene Risikofaktoren stellen Umweltkontaminanten wie PAKs (B(a)P) dar, die als Beiprodukte von Verbrennungsreaktionen und während des Erhitzens von Lebensmitteln entstehen [320]. B(a)P wird durch CYP1A-Enzyme zum mutagenen und karzinogenen BPDE katalysiert, welches DNA-Schäden und Mutationen durch DNA-Adduktbildung induziert [320]. Die genotoxischen Effekte von HNE und BPDE können durch GST-katalysierte Konjugationsreaktionen verhindert werden. Das GST-Isoenzym hGSTA4-4 besitzt eine hohe Substrataffinität gegenüber HNE [225;389], während hGSTP1-1 sowohl HNE [224] als auch BPDE konjugieren kann [227;390].

Bisher gelten hormonelle and reproduktive Faktoren als deutlichste Risikofaktoren für das Auftreten von Brusttumoren [23]. Man nimmt an, dass die Initiation durch die reaktiven Catecholestrogen-Quinone durch DNA-Schädigung ausgelöst wird [17]. *In vitro*-Experimente haben gezeigt, dass Estrogene die Fähigkeit besitzen, normale Brustepithelzellen zu transformieren [372] und DNA-Schäden in Mammazelllinien zu induzieren [322]. Auch exogene Risikofaktoren wie B(a)P können biologisch durch CYP450- und Peroxidasen-Tätigkeit oder in der Umwelt durch UV-Licht zu reaktiven Quinonen aktiviert werden [371]. Quinone, sowohl B(a)P- als auch Catecholestrogen-Quinone, sind chemisch aktive Verbindungen, die sich dem 1-Elektron-Redoxcycle mit ihrem Semiquinon-Radikal unterziehen können. Dabei entstehen ROS, die oxidative DNA-Schäden verursachen können [17;246], welche durch die NQO1-katalysierte 2-Elektronen-Reduktionsreaktion verhindert werden können.

Zur Ermittlung der chemoprotektiven Wirkung einer Soja-reichen Ernährung und damit einer hohen Exposition mit Isoflavonen (GEN) wurden die oben erwähnten relevanten Risikosubstanzen HNE, BPDE und Menadion ausgewählt (**Kapitel 4.4**). Die Ergebnisse der

Chemoprotektionsexperimente zeigten, dass die HNE-, BPDE- und Menadion-induzierten DNA-Schäden durch GEN in MCF-10A Zellen signifikant reduziert wurden. In MCF-7 Tumorzellen wurde keine Modulation der Genotoxizität beobachtet. Dabei war das antigenotoxische Potential des Isoflavons gegenüber HNE am höchsten.

Die genotoxischen Effekte von HNE und BPDE können durch GST-katalysierte Konjugationsreaktionen vermindert werden [216], jedoch weisen die einzelnen GST-Isoenzyme aufgrund ihrer Substratspezifität unterschiedliche katalytische Aktivitäten gegenüber HNE und BPDE auf (**Tabelle 5.1**).

Tabelle 5.1: Aktivitäten humaner GSTs gegenüber HNE, BPDE und CDNB

Isoenzym	Spezifische Aktivität (μmol / min / mg Protein)		
	HNE	BPDE	CDNB
hGSTA1-1	5,0	0,038	82,0 ^a
hGSTA2-2	—	—	80,0 ^a
hGSTA4-4	176,0	—	12,5 ^a
hGSTM1-1	3,2	0,57	190,0 ^a
hGSTP1-1	0,6	0,83	103,0 ^a

Alle Angaben, wenn nicht anders gekennzeichnet, stammen aus [228]; ^a) aus [217]; (—) keine Angaben.

So kann HNE zwar von vielen Isoenzymen verstoffwechselt werden, eine hohe Affinität zu diesem Oxidationsprodukt besitzt allerdings nur die hGSTA4-4 (**Tabelle 5.1**) [225;228;389]. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, bei denen Butyrat in HT29 Kolonzellen eine Induktion der hGSTA4-4 hervorrief und somit in einer reduzierten HNE-Empfindlichkeit resultierte [220;324], konnte in der vorliegenden Arbeit zwar die Expression dieses Isoenzym, aber nicht seine Induzierbarkeit durch GEN in den Mammazellen gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür besteht darin, dass die hGSTA4-4 hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist [389]. Durch Proteinkinase A und C-vermittelte Phosphorylierungsreaktionen im Zytosol erhöht sich seine Affinität zum zytoplasmatischen Chaperon Hsp70, was die mitochondriale Translokation ermöglicht [391;392]. Dies könnte eine mögliche Ursache für die geringen Konzentrationen der hGSTA4-4 im Zytosol und die nicht beobachtete Modulation in den Brustzellen sein. Im Gegensatz dazu war die hGSTP1-1, welche ebenfalls HNE detoxifiziert [224], in MCF-10A Zellen hoch exprimiert und wurde durch GEN induziert. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass hGSTP1-1 das Haupt-GST-Isoenzym darstellt, welches an der Entgiftung von HNE in den nicht-transformierten MCF-10A Zellen beteiligt ist.

Die erhöhte hGSTP1-Aktivität der MCF-10A infolge der GEN-Behandlung ist ebenfalls für die Reduktion der BPDE-vermittelten DNA-Schäden verantwortlich. Die direkte

Konjugation und Entgiftung von BPDE durch hGSTP1-1 erklärt aber nur partiell die protektive Rolle von GEN. Denn BPDE induziert auch indirekt DNA-Schäden. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass die im Comet Assay durch B(a)P oder andere “bulky adduct”-bildende Mutagene detektierten Effekte hauptsächlich aus transienten DNA-Einzelstrangbrüchen, die während der Exzisionsreparatur entstehen, resultieren [393]. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass eine erhöhte DNA-Exzisionsreparatur möglicherweise den Effekt der GST-vermittelten metabolischen Deaktivierung annulliert. Die vorliegenden Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass Gene der DNA-Reparatur (*XRCC2*), die für die Beseitigung BPDE-induzierter DNA-Schäden verantwortlich sind, in den MCF-10A Zellen durch GEN induziert wurden (**Kapitel 5.3.1**).

In diesem Zusammenhang muß auch der Einfluss von Polymorphismen auf die katalytische Effizienz der GST-Isoenzyme betrachtet werden. Der hGSTP1 Polymorphismus ist ein wichtiger Faktor für die Suszeptibilitätsunterschiede gegenüber der B(a)P-vermittelten Tumorigenese in der Bevölkerung [394;395]. So wurde in den beiden Zelllinien MCF-10A und MCF-7 für GSTP1 ein heterozygoter Sequenzpolymorphismus im Kodon 104 am Nukleotid 313 identifiziert. In einer Studie mit HepG2 Zellen, welche mit verschiedenen Varianten des *hGSTP1* Gens transfiziert worden waren, zeigten Zellen mit der Transitionsmutation am Nukleotid 313, wie im Falle der hier verwendeten Mammazelllinien, infolge der Behandlung mit BPDE signifikant weniger DNA-Addukte im Vergleich zu den Zellen mit dem Wildtyp-Allel [394]. Diese Studien demonstrieren, dass der Genotyp entscheidend für die katalytische Aktivität der Zielzellen sein kann und dass im Fall des B(a)P-Metaboliten die polymorphen Varianten effektiver entgiften. In Bezug auf die katalytische Effizienz der Varianten ist für andere Substrate jedoch das Gegenteil der Fall. Gegenüber CDNB weisen *hGSTP*A*B* exprimierende Zellen eine geringere katalytische Aktivität auf [226]. Folglich ist, in Abhängigkeit vom Substrat, der Wildtyp oder der Polymorphismus eines Enzyms für die Chemoprotektion der Zielzellen von Vorteil.

Neben der GST-Expression hat auch der intrazelluläre GSH-Spiegel Einfluss auf die Sensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien. Neben der Funktion als Kofaktor für die GSTs besitzt GSH auch direkte antioxidative Eigenschaften. Untersuchungen an HT29 clone 19a Kolonzellen bzw. MCF-7 Mammazellen zeigten, dass durch die Hemmung der GSH *de novo*-Synthese mittels Buthioninsulfoximin, einem spezifischen Inhibitor der γ -Glutamylcystein-Synthetase, die Genotoxizität von HNE bzw. H_2O_2 und E2 infolge der Depletion des intrazellulären GSH signifikant anstieg [324;338]. Andererseits ist auch der intrazelluläre GSH-Spiegel durch protektive ernährungsrelevante Substanzen modulierbar.

Bereits gezeigt wurde das für das Fermentationsprodukt Butyrat [231] und in der vorliegenden Arbeit auch für die Isoflavone GEN und EQU.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die hohe Basalexpression der hGSTP1-1 und folglich die hohe GST-Aktivität in frühen Stadien der Karzinogenese protektiv gegen HNE- und BPDE-induzierte DNA-Schäden wirken. Bestätigung findet dies in Untersuchungen von Fields *et al.*, der bei geringer GST-Expression und -Aktivität keinen Schutz gegenüber genotoxischen Effekten nachweisen konnte [390], wie dies in unserem Fall bei den tumorigenen MCF-7 Zellen zu beobachten war. Steinkellner *et al.* wiesen ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der hGSTP1-1 Induktion und verminderten BPDE-induzierten DNA-Schäden nach [367].

Die durch die quinoide Substanz Menadion induzierte Genotoxizität wurde in GEN-vorbehandelten dysplastischen MCF-10A Zellen reduziert, während in MCF-7 Zellen die DNA-Schäden durch GEN nicht moduliert wurden. Quinone werden über eine NQO1-katalysierte 2-Elektron-Reduktionsreaktion entgiftet. Somit nimmt das Phase II-Enzym eine Schlüsselrolle im Schutz der Zellen vor dem Redoxcycling, oxidativem Stress und Zytotoxizität ein [242;245]. Folglich scheinen die reduzierten Menadion-induzierten DNA-Schäden in den GEN-behandelten MCF-10A Zellen eine direkte Konsequenz der NQO1-Induktion zu sein. Die chemopräventiven Effekte einer NQO1-Induktion durch Phytoestrogene gegenüber E2- bzw. Menadion-induzierten oxidativen DNA-Schäden in Brustzellen *in vitro* wurden auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [253;396].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die GEN-vermittelte Induktion der zellulären Schutzsysteme hGSTP1 und hNQO1 in nicht-transformierten MCF-10A Zellen zu einer reduzierten Genotoxizität Brustkrebs-relevanter Karzinogene (HNE, BPDE, Menadion) führt. Diese protektiven Effekte wurden in den MCF-7 Tumorzellen nicht beobachtet. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass GEN ein chemoprotektives Potential in frühen Ereignissen der Brustkrebsentwicklung besitzt. Bedeutungsvoll sind die effektiv wirksamen Konzentrationen von $\geq 1 \mu\text{M}$, die zur Induktion der Phase II-Enzyme in diesen *in vitro*-Untersuchungen führten. Diese liegen im Bereich der physiologisch erreichbaren Plasmakonzentrationen durch Soja-haltige Ernährung. Eigene Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von GEN ergaben zudem eine 19-fache Erhöhung der intrazellulären GEN-Konzentration in den MCF-10A Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ GEN (**Kapitel 4.5**), und *in vivo*-Studien berichteten ebenfalls über einen Anstieg der Isoflavon-Konzentration im Plasma (3-5-fach) und im Brustgewebe (4-13-fach) nach Soja-Supplementation [132;133]. Bei diesen Konzentrationen war eine verstärkte Chemoprotektion

gegenüber den Karzinogenen zu beobachten. Eine regelmäßige Soja-Aufnahme wie in asiatischen Ländern, in denen die Isoflavon-Exposition während des gesamten Lebens stattfindet, trägt somit zu den protektiven Effekten der Reduktion der Genotoxizität von Risikofaktoren durch Erhöhung zellulärer Schutzsysteme bei.

5.5 MCF-10A ZELLEN WEISEN HÖHERE INTRAZELLULÄRE GENISTEINKONZENTRATIONEN AUF

Es gibt derzeit nur wenige Informationen über die verfügbaren intrazellulären Konzentrationen von Isoflavonen in Mammaepithelzellen nach Sojaverzehr.

Unsere Untersuchungen (**Kapitel 4.5**) ergaben sowohl bei MCF-10A als auch bei MCF-7 Zellen eine Abhängigkeit der intrazellulären GEN-Konzentration von der eingesetzten Konzentration (1 μM und 10 μM). Die starke Akkumulation von GEN ist durch seine hohe Affinität zu Liposomenmembranen bedingt [397]. In den dysplastischen Zellen wurden 1-12-fach höhere GEN-Konzentrationen nach 1 h und 24 h Beandlung als in den tumorigenen MCF-7 Zellen detektiert. In den MCF-7 Tumorzellen war die intrazelluläre GEN-Konzentration nach 24-stündiger Inkubation zudem geringer als nach 1-stündiger Inkubation. Diese Beobachtungen weisen möglicherweise auf eine Sättigung der Aufnahme bzw. einen effektiven Phase II- und Phase III-Metabolismus hin. Peterson *et al.*, der den Metabolismus von GEN und Biochanin A *in vitro* untersuchte, berichtete, dass Zellen wie MCF-7, für die eine geringe Isoflavon-vermittelte Wachstumshemmung (hohe EC_{50} -Werte) detektiert wurde, nur geringe Konzentrationen an unkonjugiertem GEN zeigen, während Zellen mit starker Isoflavon-vermittelter Wachstumshemmung (niedrige EC_{50} -Konzentrationen) wie MCF-10A hohe Aglykonspiegel aufweisen, was eine intrazelluläre Akkumulation erlaubt [398]. Dies könnte auch die relativen Sensitivitäten in der Isoflavon-vermittelten Wachstumshemmung der in dieser Arbeit verwendeten Mammazelllinien erklären. Die intrazelluläre Aufnahme von GEN und DAI wurde bereits in anderen Zelllinien (V79, Caco-2) untersucht [399]. Sie konnten in Einklang mit der vorliegenden Arbeit eine lineare Aufnahme der beiden Substanzen mit zunehmender Konzentration bis 50 μM beobachten. Auch *in vivo*-Studien zeigten, dass Isoflavone sich im Brustgewebe anreichern können [132;133]. Etwa 50 % der Verbindungen liegen dort als Aglykone vor. Diese Menge ist ca. 10-fach höher als der Anteil der Aglykone im Plasma, wo hauptsächlich Konjugate vorkommen [130].

Die Anteile von GEN in den Membranbestandteilen wiesen mit steigenden Konzentrationen bei beiden Zelllinien keine signifikanten Unterschiede auf. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Rüfer und Hong *et al.* zur zellulären Aufnahme von GEN und DAI bzw.

Epigallocatechin-3-Gallat in Kolonzellen überein, die ebenfalls einen konstanten Anteil in der Membranfraktion über einen Konzentrationsbereich von 1–50 μM bzw. 0,5–20 μM detektierten [399;400]. Der prozentuale Anteil von 5–30 % in der Membranfraktion bei MCF-10A und MCF-7 Zellen ist relativ gering. Der überwiegende Teil des aufgenommenen GEN findet sich somit vermutlich an Proteine gebunden im wässrigen Zytosol, was für GEN bereits gezeigt wurde [401].

Der genaue Mechanismus der Aufnahme ist bisher noch nicht geklärt, könnte aber sowohl ER-abhängig als auch ER-unabhängig sein. Gesundes Mammaepithel sowie etwa zwei Drittel aller Brusttumoren exprimieren ER [402] und könnten somit Isoflavone möglicherweise über Rezeptorbindung und zelluläre Retention konzentrieren. GEN bindet an die im Zytosol lokalisierten ER α und ER β [403]. Typ II-Estrogenbindungsstellen, welche Flavonoide mit hoher Affinität binden [404;405], könnten ebenso an der Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen auf Spiegel, die der Karzinogenese vorbeugen bzw. zelluläre Mechanismen hemmen (z. B. Tyrosinkinasen), die in Zellwachstumsprozessen involviert sind, beteiligt sein. Auch die passive Diffusion als Aufnahmemechanismus wird nicht ausgeschlossen [399].

Die Untersuchungen des Zellkulturmediums nach Inkubation mit GEN ergaben für MCF-7 Zellen keine Hinweise auf die Bildung von Phase II-Konjugaten. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür ist einerseits die geringe Basalgenexpression und die durch GEN verminderte Genexpression Fremdstoff-metabolisierender Enzyme in diesen Zellen und andererseits ein verminderter Transport der Konjugate aus der Zelle durch Transportproteine. Genauere Angaben zum Potential der Biotransformation in den MCF-7 Zellen sind jedoch nicht möglich, da die Metabolite nur im Medium und nicht im Zellysat bestimmt wurden. Im Gegensatz dazu konnten bei den MCF-10A Zellen bereits nach 1-stündiger Inkubationsdauer Phase II-Konjugate (2-5 %) im Mediumüberstand nachgewiesen werden. Die Aufklärung der Metabolite fand im Rahmen dieser Untersuchungen nicht statt, jedoch kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen um Glucuronide und Sulfate handelte. Andere Gruppen wiesen diese Konjugate als Hauptmetabolite in Enterozyten nach [101;399;406]. Die Detektion der Metabolite im Zellkulturmedium lässt auf einen effektiven Transport aus der Zelle schließen, was auch von Peterson *et al.* für Phytoestrogene an humanen Brustzelllinien beobachtet wurde [398]. Untersuchungen an Kolonzellen zeigten, dass Mitglieder der ABC-Transportmoleküle, speziell MRPs, am Efflux der Konjugate beteiligt sind [406]. Ob diese auch für den Transport der Glucuronide bzw. Sulfate aus den Brustzellen verantwortlich sind, muß jedoch noch geprüft werden.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass die intrazelluläre Anreicherung von GEN in den nicht-transformierten MCF-10A Zellen über physiologisch relevante Plasmakonzentrationen mit einer Wachstumshemmung assoziiert war, was auf eine schnellere Elimination initiiertter Zellen aus dem Gewebeverband und somit auf eine Chemoprotektion im frühen Stadium der Mammakarzinogenese hindeutet. Im Gegensatz dazu absorbierten tumorigene Zellen weniger GEN. Die geringen intrazellulären Konzentrationen führten in den *in vitro*-Wachstumsexperimenten zu einer ER-abhängigen Wachstumssteigerung. Die biologischen Effekte der Isoflavone, entweder chemoprotektiv oder tumorprogressionsfördernd, sind somit vom Transformationsgrad der Zielzellen abhängig. Sie lassen aber noch keine Schlüsse für die *in vivo*-Situation zu. Jedoch weisen Ergebnisse epidemiologischer [57;58] und Tierstudien [314;407;408] darauf hin, dass Isoflavone effektiver in frühen Stadien der Krebsentwicklung wirken, bevor der Brustkrebs-Phänotyp vollständig etabliert ist. Sie unterstützen damit die Hypothese, dass Isoflavone eine wichtige Bedeutung in der Prävention maligner Brusttumoren zukommt. Für die protektiven Wirkungen ist ebenfalls die Expositionsdauer von Bedeutung, die zudem die intrazellulären Gehalte determiniert. Zahlreiche Studien zeigten, dass eine Isoflavon-Exposition beginnend im Jugendalter zu einer frühen Differenzierung und somit geringeren Zellteilungsrate des Brustdrüsengewebes führte, das dadurch weniger sensibel für den Karzinogen-Einfluss war [57;409]. Das Brustkrebsrisiko konnte durch den Sojakonsum im Erwachsenenalter weiter reduziert werden [57]

6 ZUSAMMENGEFASSTE ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hatten zum Ziel, chemoprotektive Mechanismen der Phytoestrogene an humanen Brustzellen unterschiedlichen Transformationsgrades aufzuklären.

Aus dem **ersten Teil** der Arbeit, der sich mit den biologischen Aktivitäten Brustkrebs-relevanter Schutz- und Risikofaktoren in den humanen Mammazelllinien MCF-10A und MCF-7 beschäftigte, lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- Physiologisch relevante Konzentrationen an Phytoestrogenen zeigen in primär-ähnlichen MCF-10A Zellen antiproliferative und in tumorigenen MCF-7 Zellen proliferationsfördernde Effekte. Daraus folgt, dass die Phytoestrogene in frühen Stadien der Mammarkarzinogenese chemoprotektive Effekte entfalten, während sie die Progression bereits entarteter Zellen fördern.
- Die Beobachtung, dass Isoflavone eine 2-8-fach stärkere wachstumshemmende Aktivität als Lignane in nicht-transformierten Mammazellen aufweisen, lässt den Schluss zu, dass eine Soja-reiche Ernährung einen höheren Beitrag zur Protektion von Brustkrebs leistet als eine Vollkornprodukt-reiche Kost (Roggen, Leinsamen).
- Die Isoflavone zeigen unterschiedliche biologische Aktivitäten hinsichtlich der Zellwachstumsmodulation. Es kann angenommen werden, dass bakterielle Metabolite des Genisteins weniger aktiv sind als die Ausgangsverbindung, während bakterielle Metabolite des Daidzeins (z. B. Equol) eine stärkere Aktivität aufweisen. Die Zusammensetzung der Darmflora bestimmt somit ebenfalls das individuelle Brustkrebsrisiko.
- Ein synthetisches Isoflavon-Gemisch, bestehend aus Plasma-relevanten Anteilen an Genistein, Daidzein und Equol, zeigt im physiologisch bedeutsamen Konzentrationsbereich ($<10\ \mu\text{M}$) ein additives, wachstumshemmendes Potential in dysplastischen MCF-10A Zellen. Daraus folgt, dass bereits ein moderater Sojakonsum chemoprotektive Effekte erzielt und somit das Brustkrebsrisiko vermindert. Somit sind Soja-haltige Lebensmittel einzelnen Supplementen vorzuziehen.
- Der Anstieg der metabolischen Aktivität infolge der Isoflavon-Behandlung in den primär-ähnlichen MCF-10A Zellen ist auf eine Neuverteilung der Zellen in den Zellzyklus-Phasen zurückzuführen. Ein durch Phytoestrogene induzierter Zellzyklus-Arrest in initiierten Mammazellen kann in den programmierten Zelltod münden und beugt somit dem weiteren Fortschreiten der Karzinogenese vor.

- Gegenüber potenziellen Risikofaktoren in der Mammakarzinogenese (H_2O_2 , HNE, B(a)P, BPDE, Menadion) reagieren die transformierten MCF-7 Zellen sensibler als die nicht-transformierten MCF-10 A Zellen, d. h. Ziel muss sein, bereits die Initiation von Brustzellen zu verhindern.

Im **zweiten Teil** der Arbeit wurde der Expressionsstatus Fremdstoff-metabolisierender und oxidativer Stress-assoziiierter Enzymsysteme in den verwendeten Zelllinien bestimmt. Das Ziel war, die Sensitivitätsunterschiede der Zelllinien zu klären.

- MCF-10A und MCF-7 Zellen unterscheiden sich signifikant in der Basalexpression von Enzymsystemen der Biotransformation und des oxidativen Stresses. Dabei zeigen MCF-10A eine bessere Enzymausstattung in oxidativen Stress- und DNA-Reparatur-assoziierten Genen (*MnSOD*, *GPX1*, *MTs*, *MGSTs*, *XRCC*, *ERCC*) sowie im GSH/GST-Enzymsystem. Im Gegensatz dazu weisen MCF-7 eine höhere Expression einzelner Phase II-Enzym kodierender Gene (*COMT*, *SULT* und *UGT*) auf sowie eine höhere basale Expression des NQO1-Enzymsystems. Das Ausmaß der Expression protektiver Enzymsysteme ist abhängig vom Zelltyp. Die Enzymausstattung bestimmt das zelluläre Potential zur Chemoprotektion ist entscheidend für die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber potenziellen Risikofaktoren.

Der **dritte Teil** der Arbeit hatte zum Ziel, potenziell chemopräventive Effekte der biologisch aktivsten Phytoestrogene auf Fremdstoffmetabolismus- und oxidativer Stress-assoziierte Enzymsysteme in beiden Zelllinien zu ermitteln.

- Genistein besitzt die Fähigkeit, Phase II- und DNA-Reparaturenzyme in nicht-transformierten Mammazellen zu induzieren, welche einen Schutz vor elektrophilen Karzinogenen und Produkten des oxidativen Stresses in frühen Stadien der Tumorigenese darstellen.
- Neben der Wirkung als „blocking agent“ wirkt GEN in initiierten Zellen auch als „suppressing agent“, indem es durch die Modulation Apoptose- und Proliferations-assoziiierter Gene das Wachstum prämaligner Mammazellen inhibiert und somit die Tumorprogression verhindert.
- Die Induktion der Phase II-Enzymsysteme GST und NQO1 in dysplastischen MCF-10A Zellen durch Genistein gibt Hinweise auf eine Erhöhung des zellulären Schutzes primärer bzw. initiierten Zellen gegenüber elektrophilen Karzinogenen und Produkten des oxidativen Stresses infolge der Erhöhung der reduktiven Kapazität der Zelle. Eine lebenslange Induktion zellulärer Schutzsysteme in primären Mammazellen durch eine

Soja-reiche Ernährung stellt somit einen Beitrag zur Prävention der Brustkrebsentwicklung dar.

Der **vierte Teil** der Arbeit diente dazu, die funktionellen Konsequenzen der Genistein-induzierten Phase II-Enzymsysteme (GST, NQO1) zu ermitteln.

- Genistein reduziert die durch HNE, BPDE und Menadion induzierten DNA-Schäden in den primär-ähnlichen MCF-10A Zellen signifikant, während in den MCF-7 Tumorzellen keine Modulation der Genotoxizität zu beobachten ist. Die Genistein-vermittelte Induktion der zellulären Schutzsysteme in MCF-10A Zellen führt somit zu einer reduzierten Genotoxizität Brustkrebs-relevanter Karzinogene. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Genistein ein chemoprotektives Potential in frühen Ereignissen der Brustkrebsentwicklung besitzt. Die effektiv wirksamen Konzentrationen ($\geq 1 \mu\text{M}$) spiegeln physiologisch erreichbare Plasmakonzentrationen wider. Die Möglichkeit, durch einen lebenslangen Verzehr einer Soja-reichen Kost genotoxische Effekte zu verringern, ist hinsichtlich einer anzustrebenden Krebsprophylaxe durch die Ernährung als sehr wichtig zu beurteilen.

Im **abschließenden Teil** wurde die Bioverfügbarkeit der Isoflavone am Beispiel des effektivsten Phase II-Enzyminduktors Genistein bestimmt.

- Die Genistein-Behandlung dysplastischer MCF-10A Zellen führt zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen, die physiologische Plasmakonzentrationen überschreiten. Diese hohen Dosen sind mit einer Wachstumsinhibierung sowie Induktion zellulärer Schutzsysteme assoziiert, Mechanismen mit chemoprotektivem Potential im frühen Stadium der Mammakarzinogenese.
- Im Gegensatz dazu absorbieren tumorigene MCF-7 Zellen weniger Genistein. Diese geringen intrazellulären Konzentrationen begünstigen über einen ER-abhängigen Mechanismus der Wachstumsinduktion ein weiteres Fortschreiten des Karzinogeneseprozesses.

Übertragen auf die *in vivo*-Situation kann somit geschlussfolgert werden, dass v. a. Isoflavone als Bestandteile einer Soja-reichen Diät durch Erhöhung des zellulären Schutzes primärer bzw. initiiertter Zellen gegenüber ultimatsten Karzinogenen chemopräventiv in frühen Stadien der Brustkrebsentwicklung wirken, bevor der Brustkrebs-Phänotyp vollständig etabliert ist.

Für die Übertragbarkeit der *in vitro*-Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation ist bei den Untersuchungen mit Polyphenolen zu beachten, dass die *in vitro*-Versuchsbedingungen

weitestgehend *in vivo*-Bedingungen entsprechen. Die Aglykone, wie sie in diesen Untersuchungen verwendet wurden, sind normalerweise nicht die natürlichen Formen, mit denen die Gewebe *in vivo* exponiert sind. Der überwiegende Anteil der resorbierten Phytoestrogene, der über das Blut zu den Zielzellen des Körpers transportiert wird, sind Glucuronsäure- bzw. Sulfat-Konjugate. Diese besitzen abweichende biologische Eigenschaften und Verteilungsmuster innerhalb der Zellen und Gewebe im Vergleich zu ihren Aglykonen. Das Brustgewebe ist dagegen hauptsächlich mit den Aglykonen exponiert, wie Tierexperimente zeigten. Diese Beobachtung gibt Hinweis auf im Zielgewebe stattfindende Dekonjugationsreaktionen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit dem Einsatz der Phytoestrogen-Aglykone kommen somit der *in vivo*-Situation nahe. Desweiteren sollte der für die Experimente gewählte Konzentrationsbereich den physiologischen Konzentrationen *in vivo* entsprechen. Die getesteten Konzentrationen sollten deshalb, wie in dieser Arbeit erfolgt, den Bereich der erreichbaren Plasmakonzentrationen (0,1 – 4 µM) umfassen. Für eine korrekte Interpretation von *in vitro*-Ergebnissen muß man in der Zukunft noch stärker darauf achten, dass unter Berücksichtigung verfügbarer Daten zur Bioverfügbarkeit und zum Metabolismus der Substanzen v. a. im Organismus relevante Metabolite getestet werden. Auf diese Notwendigkeit wurde jüngst auch in der Literatur hingewiesen [410].

7 AUSBLICK

Die aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse liefern Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen bzw. Studien. So müsste noch geklärt werden, inwieweit Isoflavone, speziell das potente Genistein, die in den Brustzelllinien gering exprimierten GST-Isoformen hGSTA1/2, hGSTM1-1 induzieren können und dies in der Konsequenz Einfluss auf die Genotoxizität der als Substrate dienenden Kanzerogene hat. Auch sind die Gene der DNA-Reparatur sowie deren Modulation durch Phytoestrogene von Bedeutung. Desweiteren wäre es von Interesse, das Potential der Phytoestrogene unter simulierten physiologischen premenopausalen Bedingungen, sprich Zusatz der Hormone in Form von FCS bzw. E2 zum Zellkulturmedium, zu bestimmen. Bisher noch wenig schlüssig sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Genistein-Wirkungen in den Zellen. Es sollte demzufolge untersucht werden, ob die Enzyminduktion in den MCF-10A Zellen über ER-abhängige bzw. ER-unabhängige Signaltransduktionswege vermittelt wird.

Um einen Zusammenhang zwischen den hier vorgenommenen Untersuchungen und der *in vivo*-Situation herstellen zu können, wäre die *in vitro*-Untersuchung einer großen Anzahl von Gewebeproben sinnvoll. Allerdings ist es bei der Brust schwierig, neben Tumorgewebe auch gesundes Probenmaterial zu erhalten. Zudem stellt das Brustgewebe ein sehr inhomogenes Gewebe dar, so dass die Aufbereitung der Biopsien und die Gewinnung reiner Epithelzellfraktionen hohe Anforderungen stellt, zumal die Primärzellen, einmal aus ihrem Gewebeverband herausgelöst, nur eine begrenzte Lebenszeit und einen veränderten Metabolismus aufweisen. Anfangs wäre es notwendig primäres Brustgewebe aus Biopsien zu charakterisieren, um das Phase II-Expressionsmuster sowie inter-individuelle Variationen im Phase II-Enzymstatus der Bevölkerung abschätzen zu können. Anschließend könnten die induzierenden Wirkungen von z. B. Genistein auf Phase II-Enzyme in primären Mammaepithelzellen geprüft werden. Da in den westlichen Industrieländern eine Soja-basierte Ernährungsweise nicht so relevant ist, wäre es von Vorteil, für die westliche Ernährungsweise bedeutendere Polyphenole, wie Flavonoide aus Obst und Gemüse, hinsichtlich ihres chemopräventiven Potentials in der Mammakarzinogenese zu untersuchen. Die Durchführung einer Interventionsstudie mit Isoflavonen bzw. anderen Polyphenolen wäre anzustreben, um die Wirkung *in vivo* zu charakterisieren.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Brustkrebs zählt weltweit zur zweithäufigsten Krebsart bei Frauen, mit einem Anteil der Krebsfälle von über 50 % in entwickelten Ländern. Im Vergleich zu Nordamerika und Nord- und Westeuropa zeigen asiatische Länder eine 3-4-fach geringere Inzidenz. Innerhalb Europas weisen Finnland und Schweden niedrige Krebsinzidenzraten auf. Zahlreiche epidemiologische Studien weisen auf eine inverse Beziehung zwischen dem Krebsrisiko und einer Ernährung reich an Soja- und Vollkornprodukten, speziell Roggen und Leinsamen hin. Die wertgebenden Inhaltsstoffe, denen die protektiven Wirkungen zugeschrieben werden, sind die Isoflavone und Lignane. Schätzungen zufolge wären ein Drittel aller Krebsfälle durch Veränderung der Ernährungsgewohnheiten vermeidbar. Mögliche Mechanismen der Krebsprävention durch Ernährungsfaktoren sind die Hemmung des Zellwachstums sowie die Induktion körpereigener Schutzsysteme, zu denen die Glutathion S-Transferasen (GST) und die NAD(P)H: Quinonoxido-reduktase (NQO) als bedeutende Entgiftungsenzyme des Brustgewebes gehören. Konsequenzen einer erhöhten Entgiftungsfunktion, insbesondere bei hoher Expression detoxifizierender Enzyme, führen zu einer verminderten Exposition mit Karzinogenen und tragen damit zu einer Senkung des Krebsrisikos bei.

Zielstellung: Ziele der vorliegenden Arbeit waren, (1.) die Sensitivität humaner Mammazelllinien unterschiedlichen Transformationsgrades gegenüber relevanten Schutz- und Risikosubstanzen der Mammakarzinogenese zu ermitteln, (2.) die Basalexpression von Fremdstoffmetabolismus- und oxidativer Stress-assoziierten Enzymsystemen zu erfassen, (3.) die Wirkung der potentesten Phytoestrogene auf die Induzierbarkeit verschiedener Fremdstoff-metabolisierender und oxidativer Stress-assoziiierter Gene und speziell der GSTs und NQO1 hinsichtlich mRNA-, Protein-Expression und Aktivität, zu untersuchen, (4.) die Konsequenzen einer erhöhten Phase II-Enzymexpression auf die Chemosensitivität der Mammazellen gegenüber genotoxischen Verbindungen zu prüfen und (5.) die Bioverfügbarkeit der effektivsten protektiven Substanz als möglichen Erklärungsansatz für die Wirkungen in den Zelllinien zu bestimmen.

Material und Methoden: Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden an dysplastischen MCF-10A Zellen, die nicht-tumorigene Mammazellen repräsentieren, und der etablierten Mammakarzinomzelllinie MCF-7 durchgeführt. Als Testsubstanzen wurden sowohl isolierte Isoflavone (Genistein und Daidzein), deren bakterielle Metabolite (Dihydrogenistein, -daidzein, 6-Hydroxy-O-Demethylangolensin, O-Demethylangolensin, Equol, S-Equol), Säugerglignane (Enterolacton, Enterodiol) als auch ein synthetisches, den Plasmaanteilen entsprechendes Isoflavon-Gemisch aus Genistein, Daidzein und Equol verwendet. Die Inkubation mit diesen Testsubstanzen erfolgte über 24 – 72 h. Der weite Konzentrationsbereich in den Proliferationsversuchen diente der optimalen Dosisfindung. In den Enzym-Induktionsversuchen

wurden physiologische Konzentrationen von 1 – 10 μM und eine effektiv wachstumshemmende Konzentration von 30 μM verwendet.

Das Zellwachstum wurde nach Phytoestrogen-Behandlung mittels DNA-Färbung (DAPI) und Brom-Desoxyuridin (BrdU)-Einbau bestimmt, die metabolische Aktivität mittels spektralphotometrischer und fluorimetrischer Assays. Mit Hilfe eines cDNA-Arrays wurde die differenzielle Genexpression von 192 am Fremdstoffmetabolismus und oxidativen Stress beteiligten Genen ermittelt. Zur Untersuchung der Basalexpression der GST-Isoenzyme auf mRNA-Ebene und der Deletionspolymorphismen für hGSTM1-1 bzw. hGSTT1-1 wurde die PCR-Technik verwendet. Die Bestimmung der GST- bzw. NQO-Aktivität erfolgte spektralphotometrisch gegenüber 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) bzw. gegenüber 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Die Proteinexpression der GST-Isoenzyme A1/2, M1, M2 und P1 und der NQO1 wurde mittels Western Blot untersucht. Aktivität und Enzymprotein der GSTs wurden auf Basis des zytosolischen Proteingehaltes und der Zellzahl berechnet, da der Proteingehalt der Zellen durch die Substanzbehandlung ebenfalls moduliert wurde, während die Zellzahl eine konstante Bezugsgröße darstellte. Die mRNA-Expression der *hGSTP1*, *hGSTA4* und *hNQO1* wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR bestimmt. Die Untersuchungen zur Genotoxizität wurden mittels Comet Assay durchgeführt. Als genotoxische Verbindungen wurden die für die Brustkarzinogenese relevanten Substanzen HNE, BPDE und Menadion eingesetzt. Die Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Genistein erfolgte mittels HPLC/MS.

Ergebnisse: (1.) Sensitivität der Mammazelllinien gegenüber Schutz- und Risikosubstanzen:

Physiologisch relevante Konzentrationen an Phytoestrogenen zeigten antiproliferative Effekte in den nicht-tumorigenen MCF-10A Zellen und proliferative Effekte in den tumorigenen MCF-7 Zellen. Hinsichtlich des wachstumsmodulierenden Potentials waren Genistein und Equol die effektivsten Metabolite. Das synthetische Isoflavon-Gemisch zeigte im physiologischen Konzentrationsbereich $< 10 \mu\text{M}$ eine additiv wirkende Wachstumsinhibierung in MCF-10A und eine synergistisch wirkende Wachstumsinduktion in MCF-7. Die Phytoestrogen-Behandlung führte in MCF-10A, aber nicht in MCF-7, zu einem Anstieg der metabolischen Aktivität. Die transformierten MCF-7 Zellen zeigten signifikant höhere DNA-Strangbruchraten infolge der H_2O_2 , HNE, B(a)P, BPDE und Menadion-Behandlung im Vergleich zu den nicht-transformierten MCF-10A Zellen und reagierten somit sensibler auf potenzielle Risikofaktoren der Mammakarzinogenese.

(2.) Basalexpressionsanalysen: Differenzielle Genexpressionsanalysen ergaben signifikante Unterschiede in der Basalexpression von 30 Genen des Fremdstoffmetabolismus und von 23 oxidativer Stress- und Toxizitäts-relevanten Genen zwischen MCF-10A und MCF-7 Zellen. Untersuchungen des GST-Status zeigten Variationen im Expressionsmuster. Die hGSTP1-1 ist das dominierende Isoenzym in den primär-ähnlichen MCF-10A Zellen, während es in den MCF-7

Tumorzellen nicht exprimiert wird. Desweiteren exprimieren beide Zelllinien GST-Isoenzyme der Klassen α (hGSTA1/2, hGSTA4-4) und μ (hGSTM1-1), wenn auch nur in sehr geringen Mengen. Die hGSTM2-2 konnte nicht detektiert werden. MCF-10A besitzen einen Deletionspolymorphismus im *hGSTT1* Gen, und beide Zelllinien tragen den heterozygoten *hGSTP1*A*B* Genotyp. Bezüglich des NQO1-Status zeigten die MCF-7 Zellen eine höhere basale mRNA-Expression im Vergleich zu den MCF-10A Zellen. Die Variationen der GST- und NQO1-Enzymausstattung spiegeln die jeweiligen Unterschiede in den Aktivitäten wider.

(3.) Induzierbarkeit protektiver Enzymsysteme: Genistein induzierte in den nicht-tumorigenen MCF-10A Zellen Gene des Phase II-Metabolismus (*GSTs*, *SULTs*, *UGTs*) und der DNA-Reparatur (*XRCC*, *ERCC*), während in den tumorigenen MCF-7 Zellen Phase II-kodierende Gene herunterreguliert wurden (*GSTs*, *MTs*, *UGTs*). In Bezug auf die Induzierbarkeit der GSTs erhöhte Genistein die GST-Aktivität in MCF-10A (4,7-fach) und Equol (2,5-3-fach) in MCF-7. Genistein induzierte zudem die hGSTP1-1 Proteinexpression (2,5-fach) und *hGSTP1* mRNA (2,3-fach) in MCF-10A. Die hGSTA4-4 Expression konnte durch die Isoflavone in beiden Zelllinien nicht moduliert werden. In Bezug auf die Induzierbarkeit der NQO1 erhöhte Genistein die *hNQO1* mRNA- (2,6-fach), die hNQO1-1 Protein-Expression (3,4-fach) und die NQO1-Aktivität (1,5-fach) in MCF-10A. In MCF-7 zeigten die Phytoestrogene keine induzierenden Effekte auf das NQO1-System.

(4.) Konsequenzen der Phase II-Enzyminduktion: Als funktionelle Konsequenz eines durch Isoflavone erhöhten Phase II-Enzymstatus zeigte die Behandlung der MCF-10A, nicht aber die der MCF-7 Zellen, mit Genistein eine signifikante Reduktion der durch HNE, BPDE und Menadion-induzierten DNA-Schäden.

(5.) Bioverfügbarkeit: In den nicht-tumorigenen MCF-10A Zellen zeigte sich eine höhere intrazelluläre Akkumulation von Genistein als in den MCF-7 Zellen, die mit zunehmender Inkubationsdauer weiter anstieg.

Schlussfolgerung: Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass Phytoestrogene als Bestandteile einer Soja- und Vollkornprodukt-reichen Diät chemopräventiv auf frühe Stadien der Krebsentwicklung wirken, bevor der Brustkrebs-Phänotyp vollständig etabliert ist. Chemopräventive Wirkmechanismen sind die Hemmung des Zellwachstums, die Stimulation der Entgiftungskapazität, speziell der GSTs und NQO1, und folglich die Reduktion der Toxizität relevanter Risikofaktoren. Konsequenzen dieser Wirkmechanismen sind die Elimination initiiertter Zellen aus dem Gewebeverband und die schnellere und effektivere Ausscheidung von Karzinogenen. Die Möglichkeit, durch einen lebenslangen Verzehr einer Soja-reichen Kost der Brusttumorentwicklung vorzubeugen, ist hinsichtlich einer anzustrebenden Krebsprophylaxe durch die Ernährung als sehr wichtig zu beurteilen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches Bundesamt (2001). Statistisches Jahrbuch. Statistisches Bundesamt (Hrsg.) Metzler-Poeschel, Stuttgart.
2. Becker,N. and Wahrendorf,J. (1998). Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland / Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republik of Germany 1981-1990. Springer-Verlag, Berlin.
3. Parkin,D.M., Bray,F., Ferlay,J. et al. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int.J.Cancer*, 94, 153-156.
4. Rafter,J., Govers,M., Martel,P. et al. (2004). PASSCLAIM--diet-related cancer. *Eur.J.Nutr.*, 43 Suppl 2, II47-II84.
5. WCRF and AICR (1997). Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research, Washington DC.
6. Charpentier,A. and Aldaz,C.M. (2002). The Molecular Basis of Breast Carcinogenesis. Coleman, W. B. and Tsongalis, G. J. (Hrsg.) Human Press Inc., Totowa.
7. Russo,J. and Russo,I.H. (1987). Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest*, 57, 112-137.
8. Lopez-Otin,C. and Diamandis,E.P. (1998). Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. *Endocr.Rev.*, 19, 365-396.
9. Russo,J., Hu,Y.F., Yang,X. et al. (2000). Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst Monogr*, 17-37.
10. McKenzie,K.E. (1997). Breast Cancer: Molecular Epidemiology. Academic Press, Inc.,
11. Feigelson,H.S., McKean-Cowdin,R., Coetzee,G.A. et al. (2001). Building a multigenic model of breast cancer susceptibility: CYP17 and HSD17B1 are two important candidates. *Cancer Res*, 61, 785-789.
12. McPherson,K., Steel,C.M., Dixon,J.M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, 321, 624-628.
13. Siiteri,P.K., Murai,J.T., Hammond,G.L. et al. (1982). The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog.Horm.Res*, 38, 457-510.
14. Brinton,L.A., Schairer,C., Hoover,R.N. et al. (1988). Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Invest*, 6, 245-254.
15. White,E. (1987). Projected changes in breast cancer incidence due to the trend toward delayed childbearing. *Am J.Public Health*, 77, 495-497.
16. Feigelson,H.S. and Henderson,B.E. (1996). Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*, 17, 2279-2284.
17. Yager,J.D. (2000). Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J.Natl.Cancer Inst Monogr*, 67-73.
18. Breast cancer and hormonal contraceptives: further results. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996). *Contraception*, 54, 1S-106S.
19. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast

- cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997). *Lancet*, 350, 1047-1059.
20. Yu,H. and Rohan,T. (2000). Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J.Natl.Cancer Inst*, 92, 1472-1489.
 21. Hankinson,S.E., Willett,W.C., Colditz,G.A. et al. (1998). Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet*, 351, 1393-1396.
 22. Boice,J.D., Jr., Preston,D., Davis,F.G. et al. (1991). Frequent chest X-ray fluoroscopy and breast cancer incidence among tuberculosis patients in Massachusetts. *Radiat.Res*, 125, 214-222.
 23. Lipworth,L. (1995). Epidemiology of breast cancer. *Eur.J.Cancer Prev.*, 4, 7-30.
 24. Breast cancer: the importance of prevention (1989). *Network.*, 10, 1-3.
 25. Missmer,S.A., Smith-Warner,S.A., Spiegelman,D. et al. (2002). Meat and dairy food consumption and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int.J.Epidemiol.*, 31, 78-85.
 26. Gorlewska-Roberts,K., Green,B., Fares,M. et al. (2002). Carcinogen-DNA adducts in human breast epithelial cells. *Environ.Mol.Mutagen.*, 39, 184-192.
 27. Howe,G.R., Hirohata,T., Hislop,T.G. et al. (1990). Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J.Natl.Cancer Inst.*, 82, 561-569.
 28. Smith-Warner,S.A., Spiegelman,D., Adami,H.O. et al. (2001). Types of dietary fat and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int.J.Cancer*, 92, 767-774.
 29. Adlercreutz,H., Mousavi,Y., Hockerstedt,K. (1992). Diet and breast cancer. *Acta Oncol.*, 31, 175-181.
 30. Esterbauer,H., Eckl,P., Ortner,A. (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat.Res*, 238, 223-233.
 31. van den Brandt,P.A., Spiegelman,D., Yaun,S.S. et al. (2000). Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J.Epidemiol.*, 152, 514-527.
 32. Key,T.J., Allen,N.E., Verkasalo,P.K. et al. (2001). Energy balance and cancer: the role of sex hormones. *Proc.Nutr.Soc.*, 60, 81-89.
 33. Smith-Warner,S.A., Spiegelman,D., Yaun,S.S. et al. (1998). Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA*, 279, 535-540.
 34. Hamajima,N., Hirose,K., Tajima,K. et al. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br.J.Cancer*, 87, 1234-1245.
 35. Gerber,B., Muller,H., Reimer,T. et al. (2003). Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, 79, 265-276.
 36. Ambrosone,C.B. and Shields,P.G. (1997). Molecular epidemiology of breast cancer. *Prog.Clin.Biol.Res*, 396, 83-99.
 37. Pryor,W.A. (1997). Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. *Environ.Health Perspect.*, 105 Suppl 4, 875-882.
 38. Johnson,K.C., Hu,J., Mao,Y. (2000). Passive and active smoking and breast cancer risk in Canada, 1994-97. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. *Cancer Causes Control*, 11, 211-221.

39. Wartenberg,D., Calle,E.E., Thun,M.J. et al. (2000). Passive smoking exposure and female breast cancer mortality. *J.Natl.Cancer Inst*, 92, 1666-1673.
40. Vogel,V.G. (2000). Breast cancer prevention: a review of current evidence. *CA Cancer J.Clin.*, 50, 156-170.
41. Lipworth,L., Bailey,L.R., Trichopoulos,D. (2000). History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *J.Natl.Cancer Inst*, 92, 302-312.
42. Reynolds,T. (1991). "5-a-Day for better health" program is launched in Boston. *J.Natl.Cancer Inst*, 83, 1538-1539.
43. Favero,A., Parpinel,M., Montella,M. (1999). Energy sources and risk of cancer of the breast and colon-rectum in Italy. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 472, 51-55.
44. World Cancer Research Fund /American Institute for Cancer Research: Food, Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. (1997). Washington, DC: Am Inst Cancer Res,
45. Gandini,S., Merzenich,H., Robertson,C. et al. (2000). Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *Eur.J.Cancer*, 36, 636-646.
46. van Gils,C.H., Peeters,P.H., Bueno-de-Mesquita,H.B. et al. (2005). Consumption of vegetables and fruits and risk of breast cancer. *JAMA*, 293, 183-193.
47. Fowke,J.H., Longcope,C., Hebert,J.R. (2000). Brassica vegetable consumption shifts estrogen metabolism in healthy postmenopausal women. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 9, 773-779.
48. Levi,F., Pasche,C., Lucchini,F. et al. (2001). Dietary intake of selected micronutrients and breast-cancer risk. *Int.J.Cancer*, 91, 260-263.
49. Sellers,T.A., Kushi,L.H., Cerhan,J.R. et al. (2001). Dietary folate intake, alcohol, and risk of breast cancer in a prospective study of postmenopausal women. *Epidemiology*, 12, 420-428.
50. Hulten,K., Van Kappel,A.L., Winkvist,A. et al. (2001). Carotenoids, alpha-tocopherols, and retinol in plasma and breast cancer risk in northern Sweden. *Cancer Causes Control*, 12, 529-537.
51. Sato,R., Helzlsouer,K.J., Alberg,A.J. et al. (2002). Prospective study of carotenoids, tocopherols, and retinoid concentrations and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 11, 451-457.
52. Lubin,F., Wax,Y., Modan,B. (1986). Role of fat, animal protein, and dietary fiber in breast cancer etiology: a case-control study. *J.Natl.Cancer Inst*, 77, 605-612.
53. Goldin,B.R., Adlercreutz,H., Gorbach,S.L. et al. (1982). Estrogen excretion patterns and plasma levels in vegetarian and omnivorous women. *N.Engl.J.Med.*, 307, 1542-1547.
54. denTonkelaar,I., Keinan-Boker,L., Veer,P.V. et al. (2001). Urinary phytoestrogens and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 10, 223-228.
55. Linseisen,J., Piller,R., Hermann,S. et al. (2004). Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *Int.J.Cancer*, 110, 284-290.
56. Yamamoto,S., Sobue,T., Kobayashi,M. et al. (2003). Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J.Natl.Cancer Inst.*, 95, 906-913.
57. Wu,A.H., Wan,P., Hankin,J. et al. (2002). Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis*, 23, 1491-1496.

58. Shu,X.O., Jin,F., Dai,Q. et al. (2001). Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 10, 483-488.
59. Bernstein,L., Henderson,B.E., Hanisch,R. et al. (1994). Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *J.Natl.Cancer Inst*, 86, 1403-1408.
60. Ziegler,R.G., Hoover,R.N., Pike,M.C. et al. (1993). Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J.Natl.Cancer Inst*, 85, 1819-1827.
61. Adlercreutz,H. (1990). Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl*, 201, 3-23.
62. Arai,Y., Uehara,M., Sato,Y. et al. (2000). Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *J.Epidemiol.*, 10, 127-135.
63. Chen,Z., Zheng,W., Custer,L.J. et al. (1999). Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai. *Nutr.Cancer*, 33, 82-87.
64. de Kleijn,M.J., van der Schouw,Y.T., Wilson,P.W. et al. (2001). Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J.Nutr.*, 131, 1826-1832.
65. Erp-Baart,M.A., Brants,H.A., Kiely,M. et al. (2003). Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *Br.J.Nutr.*, 89 Suppl 1, S25-S30.
66. Keinan-Boker,L., Peeters,P.H., Mulligan,A.A. et al. (2002). Soy product consumption in 10 European countries: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr.*, 5, 1217-1226.
67. Valsta,L.M., Kilkkinen,A., Mazur,W. et al. (2003). Phyto-oestrogen database of foods and average intake in Finland. *Br.J.Nutr.*, 89 Suppl 1, S31-S38.
68. Limer,J.L. and Speirs,V. (2004). Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res.*, 6, 119-127.
69. Ho,S.C., Woo,J.L., Leung,S.S. et al. (2000). Intake of soy products is associated with better plasma lipid profiles in the Hong Kong Chinese population. *J.Nutr.*, 130, 2590-2593.
70. Adlercreutz,H., Markkanen,H., Watanabe,S. (1993). Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet*, 342, 1209-1210.
71. Pumford,S.L., Morton,M.M., Turkes,A. et al. (2002). Determination of the isoflavonoids genistein and daidzein in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Ann.Clin.Biochem.*, 39, 281-292.
72. Morton,M.S., Arisaka,O., Miyake,N. et al. (2002). Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J.Nutr.*, 132, 3168-3171.
73. Hong,S.J., Kim,S.I., Kwon,S.M. et al. (2002). Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med.J.*, 43, 236-241.
74. Adlercreutz,H., Fotsis,T., Lampe,J. et al. (1993). Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl*, 215, 5-18.

75. Adlercreutz,H. (1998). Epidemiology of phytoestrogens. Baillieres Clin.Endocrinol.Metab, 12, 605-623.
76. Adlercreutz,H. and Mazur,W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. Ann.Med., 29, 95-120.
77. Dai,Q., Shu,X.O., Jin,F. et al. (2001). Population-based case-control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. Br.J.Cancer, 85, 372-378.
78. Ingram,D., Sanders,K., Kolybaba,M. et al. (1997). Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. Lancet, 350, 990-994.
79. Pietinen,P., Stumpf,K., Mannisto,S. et al. (2001). Serum enterolactone and risk of breast cancer: a case-control study in eastern Finland. Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev., 10, 339-344.
80. Kilkkinen,A., Stumpf,K., Pietinen,P. et al. (2001). Determinants of serum enterolactone concentration. Am.J.Clin.Nutr., 73, 1094-1100.
81. Vanharanta,M., Voutilainen,S., Lakka,T.A. et al. (1999). Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: a prospective population-based case-control study. Lancet, 354, 2112-2115.
82. Keinan-Boker,L., Der Schouw,Y.T., Grobbee,D.E. et al. (2004). Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. Am.J.Clin.Nutr., 79, 282-288.
83. Grace,P.B., Taylor,J.I., Low,Y.L. et al. (2004). Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European prospective investigation of cancer and nutrition-norfolk. Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev., 13, 698-708.
84. Johnson,I.T., Williamson,G., Musk,S.R.R. (1994). Anticarcinogenic factors in plant foods: a new class of nutrients? Nutrition Research Reviews, 7, 175-204.
85. Committee on Toxicity of Chemicals in Food,C.P.a.t.E. (2003). Phytoestrogens and Health. The Food Standards Agency (Hrsg.) London.
86. Kurzer,M.S. and Xu,X. (1997). Dietary phytoestrogens. Annu.Rev.Nutr., 17, 353-381.
87. Setchell,K.D. and Cassidy,A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. J.Nutr., 129, 758S-767S.
88. Fletcher,R.J. (2003). Food sources of phyto-estrogens and their precursors in Europe. Br.J.Nutr., 89, S39-S43-
89. Liggins,J., Bluck,L.J., Runswick,S. et al. (2000). Daidzein and genistein contents of vegetables. Br.J.Nutr., 84, 717-725.
90. USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods, Release 1.3 - 2002.<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html> (2002).
91. Coward,L., Barnes,N.C., Setchell,K.D. et al. (1993). Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. J.Agric.Food Chem., 41, 1961-1967.
92. Klus,K. and Barz,W. (1998). Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin A by bacteria isolated from tempeh. Phytochemistry, 47, 1046-1048.

93. Esaki,H., Kawakishi,S., Morimitsu,Y. et al. (1999). New potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in fermented Japanese soybean products. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 63, 1637-1639.
94. Horn-Ross,P.L., Barnes,S., Lee,M. et al. (2000). Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes Control*, 11, 289-298.
95. Milligan,S.R., Kalita,J.C., Heyerick,A. et al. (1999). Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 84, 2249-2252.
96. Heinonen,S., Nurmi,T., Liukkonen,K. et al. (2001). In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J.Agric.Food Chem.*, 49, 3178-3186.
97. Wang,H.-J. and Murphy,P.A. (1994). Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J.Agric.Food Chem.*, 42, 1674-1677.
98. Jackson,M.J. (1977). The assessment of the bioavailability of micronutrients: introduction. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51, S1-S2.
99. Setchell,K.D., Brown,N.M., Zimmer-Nechemias,L. et al. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J.Clin.Nutr.*, 76, 447-453.
100. Gee,J.M., DuPont,M.S., Rhodes,M.J. et al. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic.Biol.Med.*, 25, 19-25.
101. Andlauer,W., Kolb,J., Stehle,P. et al. (2000). Absorption and metabolism of genistein in isolated rat small intestine. *J.Nutr.*, 130, 843-846.
102. Oitate,M., Nakaki,R., Koyabu,N. et al. (2001). Transcellular transport of genistein, a soybean-derived isoflavone, across human colon carcinoma cell line (Caco-2). *Biopharm.Drug Dispos.*, 22, 23-29.
103. Hur,H.G., Lay,J.O., Jr., Beger,R.D. et al. (2000). Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch.Microbiol.*, 174, 422-428.
104. Hur,H.G., Beger,R.D., Heinze,T.M. et al. (2002). Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein. *Arch.Microbiol.*, 178, 8-12.
105. Rowland,I., Wiseman,H., Sanders,T. et al. (1999). Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora. *Biochem.Soc.Trans.*, 27, 304-308.
106. Morton,M.S., Matos-Ferreira,A., Abranches-Monteiro,L. et al. (1997). Measurement and metabolism of isoflavonoids and lignans in the human male. *Cancer Lett.*, 114, 145-151.
107. Wilkinson,A.P., Gee,J.M., DuPont,M.S. et al. (2003). Hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase is the first step in the uptake of daidzein glucosides by rat small intestine in vitro. *Xenobiotica*, 33, 255-264.
108. Allred,C.D., Ju,Y.H., Allred,K.F. et al. (2001). Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis*, 22, 1667-1673.
109. Franke,A.A., Custer,L.J., Hundahl,S.A. (2004). Determinants for urinary and plasma isoflavones in humans after soy intake. *Nutr.Cancer*, 50, 141-154.

110. Bowey,E., Adlercreutz,H., Rowland,I. (2003). Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem.Toxicol.*, 41, 631-636.
111. Setchell,K.D., Lawson,A.M., Borriello,S.P. et al. (1981). Lignan formation in man--microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet*, 2, 4-7.
112. Xie,L.H., Akao,T., Hamasaki,K. et al. (2003). Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)*, 51, 508-515.
113. Jacobs,E., Kulling,S.E., Metzler,M. (1999). Novel metabolites of the mammalian lignans enterolactone and enterodiols in human urine. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 68, 211-218.
114. Muthyala,R.S., Ju,Y.H., Sheng,S. et al. (2004). Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg.Med.Chem.*, 12, 1559-1567.
115. Chang,Y.C. and Nair,M.G. (1995). Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *J.Nat.Prod.*, 58, 1892-1896.
116. Joannou,G.E., Kelly,G.E., Reeder,A.Y. et al. (1995). A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 54, 167-184.
117. Heinonen,S., Wahala,K., Adlercreutz,H. (1999). Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds. *Anal.Biochem.*, 274, 211-219.
118. Wang,X.L., Shin,K.H., Hur,H.G. et al. (2005). Enhanced biosynthesis of dihydrodaidzein and dihydrogenistein by a newly isolated bovine rumen anaerobic bacterium. *J.Biotechnol.*, 115, 261-269.
119. Schoefer,L., Mohan,R., Braune,A. et al. (2002). Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*. *FEMS Microbiol.Lett.*, 208, 197-202.
120. Kulling,S.E., Honig,D.M., Simat,T.J. et al. (2000). Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J.Agric.Food Chem.*, 48, 4963-4972.
121. Kulling,S.E., Honig,D.M., Metzler,M. (2001). Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *J.Agric.Food Chem.*, 49, 3024-3033.
122. Roberts-Kirchhoff,E.S., Crowley,J.R., Hollenberg,P.F. et al. (1999). Metabolism of genistein by rat and human cytochrome P450s. *Chem.Res Toxicol.*, 12, 610-616.
123. Bingham,S.A., Atkinson,C., Liggins,J. et al. (1998). Phyto-oestrogens: where are we now? *Br.J.Nutr.*, 79, 393-406.
124. Sfakianos,J., Coward,L., Kirk,M. et al. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J.Nutr.*, 127, 1260-1268.
125. Adlercreutz,H., van der,W.J., Kinzel,J. et al. (1995). Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 52, 97-103.

126. Shelnutt, S.R., Cimino, C.O., Wiggins, P.A. et al. (2002). Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am J.Clin.Nutr.*, 76, 588-594.
127. Setchell, K.D. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J.Clin.Nutr.*, 68, 1333S-1346S.
128. Barnes, S., Sfakianos, J., Coward, L. et al. (1996). Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 401, 87-100.
129. Lampe, J.W. (2003). Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J.Nutr.*, 133 Suppl 3, 956S-964S.
130. Chang, H.C., Churchwell, M.I., Delclos, K.B. et al. (2000). Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J.Nutr.*, 130, 1963-1970.
131. Coldham, N.G. and Sauer, M.J. (2000). Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 164, 206-215.
132. Hargreaves, D.F., Potten, C.S., Harding, C. et al. (1999). Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 84, 4017-4024.
133. Maubach, J., Bracke, M.E., Heyerick, A. et al. (2003). Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 784, 137-144.
134. Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L. et al. (2003). Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br.J.Nutr.*, 89 Suppl 1, S45-S58.
135. Kuijsten, A., Arts, I.C., Vree, T.B. et al. (2005). Pharmacokinetics of enterolignans in healthy men and women consuming a single dose of secoisolariciresinol diglucoside. *J.Nutr.*, 135, 795-801.
136. Axelson, M. and Setchell, K.D. (1980). Conjugation of lignans in human urine. *FEBS Lett.*, 122, 49-53.
137. Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T. et al. (1998). Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J.Nutr.*, 128, 1710-1715.
138. Xu, X., Wang, H.J., Murphy, P.A. et al. (1994). Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J.Nutr.*, 124, 825-832.
139. King, R.A. and Bursill, D.B. (1998). Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am J.Clin.Nutr.*, 67, 867-872.
140. Setchell, K.D., Brown, N.M., Desai, P. et al. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J.Nutr.*, 131, 1362S-1375S.
141. Setchell, K.D., Faughnan, M.S., Avades, T. et al. (2003). Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of 13C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J.Clin.Nutr.*, 77, 411-419.
142. Mazur, W.M., Uehara, M., Wahala, K. et al. (2000). Phyto-oestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects. *Br.J.Nutr.*, 83, 381-387.
143. Penalvo, J.L., Heinonen, S.M., Nurmi, T. et al. (2004). Plant lignans in soy-based health supplements. *J.Agric.Food Chem.*, 52, 4133-4138.

144. Rowland,I.R., Wiseman,H., Sanders,T.A. et al. (2000). Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr.Cancer*, 36, 27-32.
145. Karr,S.C., Lampe,J.W., Hutchins,A.M. et al. (1997). Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. *Am J.Clin.Nutr.*, 66, 46-51.
146. Nesbitt,P.D., Lam,Y., Thompson,L.U. (1999). Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. *Am J.Clin.Nutr.*, 69, 549-555.
147. Slavin,J.L., Karr,S.C., Hutchins,A.M. et al. (1998). Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion. *Am J.Clin.Nutr.*, 68, 1492S-1495S.
148. Lampe,J.W., Karr,S.C., Hutchins,A.M. et al. (1998). Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 217, 335-339.
149. Lampe,J.W., Gustafson,D.R., Hutchins,A.M. et al. (1999). Urinary isoflavonoid and lignan excretion on a Western diet: relation to soy, vegetable, and fruit intake. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 8, 699-707.
150. Tew,B.Y., Xu,X., Wang,H.J. et al. (1996). A diet high in wheat fiber decreases the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women. *J.Nutr.*, 126, 871-877.
151. Kirkman,L.M., Lampe,J.W., Campbell,D.R. et al. (1995). Urinary lignan and isoflavonoid excretion in men and women consuming vegetable and soy diets. *Nutr.Cancer*, 24, 1-12.
152. Jacobs,D.R., Jr., Pereira,M.A., Stumpf,K. et al. (2002). Whole grain food intake elevates serum enterolactone. *Br.J.Nutr.*, 88, 111-116.
153. Setchell,K.D., Zimmer-Nechemias,L., Cai,J. et al. (1998). Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J.Clin.Nutr.*, 68, 1453S-1461S.
154. Faughnan,M.S., Hawdon,A., Ah-Singh,E. et al. (2004). Urinary isoflavone kinetics: the effect of age, gender, food matrix and chemical composition. *Br.J.Nutr.*, 91, 567-574.
155. Frankenfeld,C.L., Atkinson,C., Thomas,W.K. et al. (2004). Familial correlations, segregation analysis, and nongenetic correlates of soy isoflavone-metabolizing phenotypes. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, 229, 902-913.
156. Xu,X., Wang,H.J., Murphy,P.A. et al. (2000). Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women. *J.Nutr.*, 130, 798-801.
157. Izumi,T., Piskula,M.K., Osawa,S. et al. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J.Nutr.*, 130, 1695-1699.
158. Kuiper,G.G., Carlsson,B., Grandien,K. et al. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138, 863-870.
159. Birt,D.F., Hendrich,S., Wang,W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol.Ther.*, 90, 157-177.
160. Kuiper,G.G., Lemmen,J.G., Carlsson,B. et al. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139, 4252-4263.
161. Cassidy,A. and Faughnan,M. (2000). Phyto-oestrogens through the life cycle. *Proc.Nutr.Soc.*, 59, 489-496.

162. McKenna,N.J., Xu,J., Nawaz,Z. et al. (1999). Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 69, 3-12.
163. Brzozowski,A.M., Pike,A.C., Dauter,Z. et al. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389, 753-758.
164. Tham,D.M., Gardner,C.D., Haskell,W.L. (1998). Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 83, 2223-2235.
165. Adlercreutz,H., Bannwart,C., Wahala,K. et al. (1993). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 44, 147-153.
166. Makela,S., Poutanen,M., Lehtimäki,J. et al. (1995). Estrogen-specific 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 208, 51-59.
167. Nettleton,J.A., Greany,K.A., Thomas,W. et al. (2005). The effect of soy consumption on the urinary 2:16-hydroxyestrone ratio in postmenopausal women depends on equol production status but is not influenced by probiotic consumption. *J.Nutr.*, 135, 603-608.
168. Low,Y.L., Taylor,J.I., Grace,P.B. et al. (2005). Phytoestrogen exposure correlation with plasma estradiol in postmenopausal women in European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Norfolk may involve diet-gene interactions. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 14, 213-220.
169. Wong,C.K. and Keung,W.M. (1997). Daidzein sulfoconjugates are potent inhibitors of sterol sulfatase (EC 3.1.6.2). *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 233, 579-583.
170. Mousavi,Y. and Adlercreutz,H. (1993). Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*, 58, 301-304.
171. Pino,A.M., Valladares,L.E., Palma,M.A. et al. (2000). Dietary isoflavones affect sex hormone-binding globulin levels in postmenopausal women. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 85, 2797-2800.
172. Phipps,W.R., Martini,M.C., Lampe,J.W. et al. (1993). Effect of flax seed ingestion on the menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 77, 1215-1219.
173. Chang,W.H., Liu,J.J., Chen,C.H. et al. (2002). Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by fermented soy milk. *Nutr.Cancer*, 43, 214-226.
174. Shao,Z.M., Alpaugh,M.L., Fontana,J.A. et al. (1998). Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. *J.Cell Biochem.*, 69, 44-54.
175. Spinozzi,F., Pagliacci,M.C., Migliorati,G. et al. (1994). The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Leuk.Res.*, 18, 431-439.
176. Xiang,H., Schevzov,G., Gunning,P. et al. (2002). A comparative study of growth-inhibitory effects of isoflavones and their metabolites on human breast and prostate cancer cell lines. *Nutr.Cancer*, 42, 224-232.
177. Fotsis,T., Pepper,M.S., Montesano,R. et al. (1998). Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. *Baillieres Clin.Endocrinol.Metab*, 12, 649-666.
178. Akiyama,T., Ishida,J., Nakagawa,S. et al. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J.Biol.Chem.*, 262, 5592-5595.

179. Pagliacci, M.C., Smacchia, M., Migliorati, G. et al. (1994). Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur.J.Cancer*, 30A, 1675-1682.
180. Rickard, S.E., Yuan, Y.V., Thompson, L.U. (2000). Plasma insulin-like growth factor I levels in rats are reduced by dietary supplementation of flaxseed or its lignan secoisolariciresinol diglycoside. *Cancer Lett.*, 161, 47-55.
181. Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, K.D. et al. (1990). Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog.Clin.Biol.Res.*, 347, 239-253.
182. Serraino, M. and Thompson, L.U. (1992). The effect of flaxseed supplementation on the initiation and promotional stages of mammary tumorigenesis. *Nutr.Cancer*, 17, 153-159.
183. Thompson, L.U., Rickard, S.E., Orcheson, L.J. et al. (1996). Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 17, 1373-1376.
184. Dreher, D. and Junod, A.F. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur.J.Cancer*, 32A, 30-38.
185. Aruoma, O.I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem.Toxicol.*, 32, 671-683.
186. Cerutti, P.A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227, 375-381.
187. Mitchell, J.H., Gardner, P.T., McPhail, D.B. et al. (1998). Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch.Biochem.Biophys.*, 360, 142-148.
188. Arora, A., Nair, M.G., Strasburg, G.M. (1998). Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch.Biochem.Biophys.*, 356, 133-141.
189. Prasad, K. (1997). Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed. *Mol.Cell Biochem.*, 168, 117-123.
190. Beaglehole, R. (1990). International trends in coronary heart disease mortality, morbidity, and risk factors. *Epidemiol.Rev.*, 12, 1-15.
191. Lucas, E.A., Wild, R.D., Hammond, L.J. et al. (2002). Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 87, 1527-1532.
192. Zhan, S. and Ho, S.C. (2005). Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am J.Clin.Nutr.*, 81, 397-408.
193. Van Patten, C.L., Olivotto, I.A., Chambers, G.K. et al. (2002). Effect of soy phytoestrogens on hot flashes in postmenopausal women with breast cancer: a randomized, controlled clinical trial. *J.Clin.Oncol.*, 20, 1449-1455.
194. Washburn, S., Burke, G.L., Morgan, T. et al. (1999). Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause.*, 6, 7-13.
195. Wilcox, G., Wahlqvist, M.L., Burger, H.G. et al. (1990). Oestrogenic effects of plant foods in postmenopausal women. *BMJ*, 301, 905-906.
196. Anderson, J.J., Chen, X., Boass, A. et al. (2002). Soy isoflavones: no effects on bone mineral content and bone mineral density in healthy, menstruating young adult women after one year. *J.Am Coll.Nutr.*, 21, 388-393.

197. Messina,M., Ho,S., Alekel,D.L. (2004). Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care*, 7, 649-658.
198. Di Virgilio,A.L., Iwami,K., Watjen,W. et al. (2004). Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicol.Lett.*, 151, 151-162.
199. Kulling,S.E., Rosenberg,B., Jacobs,E. et al. (1999). The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch.Toxicol.*, 73, 50-54.
200. Schmitt,E., Metzler,M., Jonas,R. et al. (2003). Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. *Mutat.Res*, 542, 43-48.
201. Pool-Zobel,B.L., Adlercreutz,H., Glei,M. et al. (2000). Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis*, 21, 1247-1252.
202. Markovits,J., Linassier,C., Fosse,P. et al. (1989). Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.*, 49, 5111-5117.
203. Bolton,J.L. (2002). Quinoids, quinoid radicals, and phenoxy radicals formed from estrogens and antiestrogens. *Toxicology*, 177, 55-65.
204. Record,I.R., Jannes,M., Dreosti,I.E. et al. (1995). Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. *Food Chem.Toxicol.*, 33, 919-922.
205. Miltyk,W., Craciunescu,C.N., Fischer,L. et al. (2003). Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *Am J.Clin.Nutr.*, 77, 875-882.
206. Setchell,K.D., Zimmer-Nechemias,L., Cai,J. et al. (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*, 350, 23-27.
207. Kulling,S.E., Jacobs,E., Pfeiffer,E. et al. (1998). Studies on the genotoxicity of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol and their metabolic precursors at various endpoints in vitro. *Mutat.Res*, 416, 115-124.
208. Sporn,M.B. (1976). Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res*, 36, 2699-2702.
209. Mukhtar,H. and Ahmad,N. (1999). Green tea in chemoprevention of cancer. *Toxicol.Sci.*, 52, 111-117.
210. Wattenberg,L.W. (1983). Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res*, 43, 2448s-2453s.
211. Wattenberg,L.W. (1992). Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res*, 52, 2085s-2091s.
212. Sporn,M.B. (1993). Chemoprevention of cancer. *Lancet*, 342, 1211-1213.
213. (2004). *Lehrbuch der Toxikologie*. Marquardt, H. and Schaefer, S. (Hrsg.) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
214. Keppler,D. (1999). Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic.Biol.Med.*, 27, 985-991.

215. Talalay,P., Fahey,J.W., Holtzclaw,W.D. et al. (1995). Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol.Lett.*, 82-83, 173-179.
216. Hayes,J.D., Flanagan,J.U., Jowsey,I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 45, 51-88.
217. Hayes,J.D. and Pulford,D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.*, 30, 445-600.
218. Mannervik,B., Awasthi,Y.C., Board,P.G. et al. (1992). Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem.J.*, 282 (Pt 1), 305-306.
219. Ebert,M.N., Klinder,A., Peters,W.H. et al. (2003). Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis*, 24, 1637-1644.
220. Pool-Zobel,B.L., Selvaraju,V., Sauer,J. et al. (2005). Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis*, 26, 1064-1076.
221. Awasthi,Y.C., Sharma,R., Singhal,S.S. (1994). Human glutathione S-transferases. *Int.J.Biochem.*, 26, 295-308.
222. Montano,M.M., Deng,H., Liu,M. et al. (2004). Transcriptional regulation by the estrogen receptor of antioxidative stress enzymes and its functional implications. *Oncogene*, 23, 2442-2453.
223. Forrester,L.M., Hayes,J.D., Millis,R. et al. (1990). Expression of glutathione S-transferases and cytochrome P450 in normal and tumor breast tissue. *Carcinogenesis*, 11, 2163-2170.
224. Berhane,K., Widersten,M., Engstrom,A. et al. (1994). Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91, 1480-1484.
225. Hubatsch,I., Ridderstrom,M., Mannervik,B. (1998). Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem.J.*, 330, 175-179.
226. Eaton,D.L. and Bammler,T.K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol.Sci.*, 49, 156-164.
227. Sundberg,K., Widersten,M., Seidel,A. et al. (1997). Glutathione conjugation of bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferases M1-1 and P1-1. *Chem.Res.Toxicol.*, 10, 1221-1227.
228. Ketterer,B. (1998). Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage. *Free Radic.Res*, 28, 647-658.
229. Ambrosone,C.B., McCann,S.E., Freudenheim,J.L. et al. (2004). Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J.Nutr.*, 134, 1134-1138.
230. Pool-Zobel,B.L., Bub,A., Liegibel,U.M. et al. (1998). Mechanisms by which vegetable consumption reduces genetic damage in humans. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 7, 891-899.
231. Ebert,M.N., Beyer-Sehlmeyer,G., Liegibel,U.M. et al. (2001). Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr.Cancer*, 41, 156-164.

232. Moffat,G.J., McLaren,A.W., Wolf,C.R. (1994). Involvement of Jun and Fos proteins in regulating transcriptional activation of the human pi class glutathione S-transferase gene in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells. *J.Biol.Chem.*, 269, 16397-16402.
233. Desmots,F., Rauch,C., Henry,C. et al. (1998). Genomic organization, 5'-flanking region and chromosomal localization of the human glutathione transferase A4 gene. *Biochem.J.*, 336, 437-442.
234. Xia,C., Hu,J., Ketterer,B. et al. (1996). The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem.J.*, 313, 155-161.
235. Begleiter,A. and Lange,L. (2002). Lack of NQO1 induction in human tumor cells is not due to changes in the promoter region of the gene. *Int.J.Oncol.*, 20, 835-838.
236. Jaiswal,A.K. (1991). Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry*, 30, 10647-10653.
237. Jaiswal,A.K., Burnett,P., Adesnik,M. et al. (1990). Nucleotide and deduced amino acid sequence of a human cDNA (NQO2) corresponding to a second member of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene family. Extensive polymorphism at the NQO2 gene locus on chromosome 6. *Biochemistry*, 29, 1899-1906.
238. Strassburg,A., Strassburg,C.P., Manns,M.P. et al. (2002). Differential gene expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and NRH:quinone oxidoreductase in human hepatocellular and biliary tissue. *Mol.Pharmacol.*, 61, 320-325.
239. Schlager,J.J. and Powis,G. (1990). Cytosolic NAD(P)H:(quinone-acceptor)oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol. *Int.J.Cancer*, 45, 403-409.
240. Siegel,D. and Ross,D. (2000). Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radic.Biol.Med.*, 29, 246-253.
241. Traver,R.D., Siegel,D., Beall,H.D. et al. (1997). Characterization of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *Br.J.Cancer*, 75, 69-75.
242. Ross,D., Kepa,J.K., Winski,S.L. et al. (2000). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem.Biol.Interact.*, 129, 77-97.
243. Belinsky,M. and Jaiswal,A.K. (1993). NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev.*, 12, 103-117.
244. Long,D.J., Waikel,R.L., Wang,X.J. et al. (2000). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 60, 5913-5915.
245. Joseph,P. and Jaiswal,A.K. (1994). NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91, 8413-8417.
246. Flowers,L., Ohnishi,S.T., Penning,T.M. (1997). DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and o-semiquinone anion radicals. *Biochemistry*, 36, 8640-8648.
247. Prochaska,H.J. and Talalay,P. (1988). Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res*, 48, 4776-4782.

248. Bonnesen,C., Eggleston,I.M., Hayes,J.D. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res*, 61, 6120-6130.
249. Brooks,J.D., Paton,V.G., Vidanes,G. (2001). Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 10, 949-954.
250. Benson,A.M., Hunkeler,M.J., Talalay,P. (1980). Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 77, 5216-5220.
251. Valerio,L.G., Jr., Kepa,J.K., Pickwell,G.V. et al. (2001). Induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. *Toxicol.Lett.*, 119, 49-57.
252. Wang,W., Liu,L.Q., Higuchi,C.M. et al. (1998). Induction of NADPH:quinone reductase by dietary phytoestrogens in colonic Colo205 cells. *Biochem.Pharmacol.*, 56, 189-195.
253. Bianco,N.R., Chaplin,L.J., Montano,M.M. (2005). Differential induction of quinone reductase by phytoestrogens and protection against oestrogen-induced DNA damage. *Biochem.J.*, 385, 279-287.
254. Riley,R.J. and Workman,P. (1992). DT-diaphorase and cancer chemotherapy. *Biochem.Pharmacol.*, 43, 1657-1669.
255. Venugopal,R. and Jaiswal,A.K. (1998). Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene*, 17, 3145-3156.
256. Yao,K.S., Hageboutros,A., Ford,P. et al. (1997). Involvement of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB transcription factors in the control of the DT-diaphorase expression induced by mitomycin C treatment. *Mol.Pharmacol.*, 51, 422-430.
257. Li,Y. and Jaiswal,A.K. (1992). Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. *J.Biol.Chem.*, 267, 15097-15104.
258. Soule,H.D., Maloney,T.M., Wolman,S.R. et al. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*, 50, 6075-6086.
259. Soule,H.D., Vazquez,J., Long,A. et al. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst*, 51, 1409-1416.
260. Liu,S. and Lin,Y.C. (2004). Transformation of MCF-10A human breast epithelial cells by zeranol and estradiol-17beta. *Breast J.*, 10, 514-521.
261. Sandstroem,B. (1965). Studies on cells from liver tissue cultivated in vitro. I. Influence of the culture method on cell morphology and growth pattern. *Exp.Cell Res*, 37, 552-568.
262. Latza,U., Niedobitek,G., Schwarting,R. et al. (1990). Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia. *J.Clin.Pathol.*, 43, 213-219.
263. Saalbach,A., Kraft,R., Herrmann,K. et al. (1998). The monoclonal antibody AS02 recognizes a protein on human fibroblasts being highly homologous to Thy-1. *Arch.Dermatol.Res*, 290, 360-366.
264. Schaeferhenrich,A. (2004). Untersuchungen zu Mechanismen der ernährungsbedingten Kolonkarzinogenese: Genspezifische Schäden in humanen Kolonzellen durch endogene Risikofaktoren. Dissertation,

265. Weise,A., Heller,A., Starke,H. et al. (2003). Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet.Genome Res*, 103, 34-39.
266. Poliseno,L., Mariani,L., Collecchi,P. et al. (2002). Bcl2-negative MCF7 cells overexpress p53: implications for the cell cycle and sensitivity to cytotoxic drugs. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 50, 127-130.
267. McCaffrey,T.A., Agarwal,L.A., Weksler,B.B. (1988). A rapid fluorometric DNA assay for the measurement of cell density and proliferation in vitro. *In Vitro Cell Dev.Biol.*, 24, 247-252.
268. Magaud,J.P., Sargent,I., Mason,D.Y. (1988). Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J.Immunol.Methods*, 106, 95-100.
269. Porstmann,T., Ternynck,T., Avrameas,S. (1985). Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J.Immunol.Methods*, 82, 169-179.
270. Mosmann,T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods*, 65, 55-63.
271. Carmichael,J., DeGraff,W.G., Gazdar,A.F. et al. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 47, 936-942.
272. Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*, 162, 156-159.
273. Bell,D.A., Taylor,J.A., Paulson,D.F. et al. (1993). Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J.Natl.Cancer Inst*, 85, 1159-1164.
274. Katoh,T., Nagata,N., Kuroda,Y. et al. (1996). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 17, 1855-1859.
275. Pemble,S., Schroeder,K.R., Spencer,S.R. et al. (1994). Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem.J.*, 300, 271-276.
276. Harries,L.W., Stubbins,M.J., Forman,D. et al. (1997). Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, 18, 641-644.
277. Higuchi,R., Dollinger,G., Walsh,P.S. et al. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)*, 10, 413-417.
278. Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72, 248-254.
279. Compton,S.J. and Jones,C.G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal.Biochem.*, 151, 369-374.
280. Ebert,M.N. (2003). Einfluß kurzkettiger Fettsäuren und sekundärer Pflanzenstoffe auf den Glutathion S-Transferasen-Status im Kolon. Dissertation,
281. Habig,W.H., Pabst,M.J., Jakoby,W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol.Chem.*, 249, 7130-7139.

282. Prochaska,H.J. and Santamaria,A.B. (1988). Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal.Biochem.*, 169, 328-336.
283. Singh,N.P., McCoy,M.T., Tice,R.R. et al. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp.Cell Res*, 175, 184-191.
284. Pool-Zobel,B.L., Bub,A., Muller,H. et al. (1997). Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18, 1847-1850.
285. Akaza,H., Miyanaga,N., Takashima,N. et al. (2002). Is daidzein non-metabolizer a high risk for prostate cancer? A case-controlled study of serum soybean isoflavone concentration. *Jpn.J.Clin.Oncol.*, 32, 296-300.
286. Morton,M.S., Chan,P.S., Cheng,C. et al. (1997). Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *Prostate*, 32, 122-128.
287. Skog,S., He,Q., Khoshnoud,R. et al. (2004). Genes related to growth regulation, DNA repair and apoptosis in an oestrogen receptor-negative (MDA-231) versus an oestrogen receptor-positive (MCF-7) breast tumour cell line. *Tumour.Biol.*, 25, 41-47.
288. Strange,R.C. and Fryer,A.A. (1999). The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci.Publ.*, 231-249.
289. Helzlsouer,K.J., Selmin,O., Huang,H.Y. et al. (1998). Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst*, 90, 512-518.
290. Mitrunen,K., Jourenkova,N., Kataja,V. et al. (2001). Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 10, 229-236.
291. Golub,T.R., Slonim,D.K., Tamayo,P. et al. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286, 531-537.
292. Tait,L., Soule,H.D., Russo,J. (1990). Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*, 50, 6087-6094.
293. Weise,A., Heller,A., Starke,H. et al. (2003). Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet.Genome Res*, 103, 34-39.
294. Jojovic,M., Adam,E., Zangemeister-Wittke,U. et al. (1998). Epithelial glycoprotein-2 expression is subject to regulatory processes in epithelial-mesenchymal transitions during metastases: an investigation of human cancers transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Histochem.J.*, 30, 723-729.
295. Osborne,C.K., Hobbs,K., Trent,J.M. (1987). Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat.*, 9, 111-121.
296. Bahia,H., Ashman,J.N., Cawkwell,L. et al. (2002). Karyotypic variation between independently cultured strains of the cell line MCF-7 identified by multicolour fluorescence in situ hybridization. *Int.J.Oncol.*, 20, 489-494.
297. Lane,M.A., Romagnoli,L., Cruise,B. et al. (1999). Spontaneous conversion to estrogen receptor expression by the human breast epithelial cell line, MCF-10A. *Oncol.Rep.*, 6, 507-511.

298. Tanos,V., Brzezinski,A., Drize,O. et al. (2002). Synergistic inhibitory effects of genistein and tamoxifen on human dysplastic and malignant epithelial breast cells in vitro. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.*, 102, 188-194.
299. Hsieh,C.Y., Santell,R.C., Haslam,S.Z. et al. (1998). Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 58, 3833-3838.
300. Ying,C., Hsu,J.T., Hung,H.C. et al. (2002). Growth and cell cycle regulation by isoflavones in human breast carcinoma cells. *Reprod.Nutr.Dev.*, 42, 55-64.
301. Sathyamoorthy,N. and Wang,T.T. (1997). Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *Eur.J.Cancer*, 33, 2384-2389.
302. Mousavi,Y. and Adlercreutz,H. (1992). Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 41, 615-619.
303. Welshons,W.V., Murphy,C.S., Koch,R. et al. (1987). Stimulation of breast cancer cells in vitro by the environmental estrogen enterolactone and the phytoestrogen equol. *Breast Cancer Res Treat.*, 10, 169-175.
304. Shao,Z.M., Shen,Z.Z., Fontana,J.A. et al. (2000). Genistein's "ER-dependent and independent" actions are mediated through ER pathways in ER-positive breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res*, 20, 2409-2416.
305. Maggiolini,M., Bonofiglio,D., Marsico,S. et al. (2001). Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol.Pharmacol.*, 60, 595-602.
306. Wang,T.T., Sathyamoorthy,N., Phang,J.M. (1996). Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis*, 17, 271-275.
307. Zava,D.T. and Duwe,G. (1997). Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutr.Cancer*, 27, 31-40.
308. Saarinen,N.M., Huovinen,R., Warri,A. et al. (2002). Enterolactone inhibits the growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinomas in the rat. *Mol.Cancer Ther.*, 1, 869-876.
309. Chen,J., Stavro,P.M., Thompson,L.U. (2002). Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor. *Nutr.Cancer*, 43, 187-192.
310. Davis,J.N., Singh,B., Bhuiyan,M. et al. (1998). Genistein-induced upregulation of p21WAF1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells. *Nutr.Cancer*, 32, 123-131.
311. Leung,L.K. and Wang,T.T. (2000). Bcl-2 is not reduced in the death of MCF-7 cells at low genistein concentration. *J.Nutr.*, 130, 2922-2926.
312. Li,Y., Upadhyay,S., Bhuiyan,M. et al. (1999). Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene*, 18, 3166-3172.
313. Pagliacci,M.C., Spinozzi,F., Migliorati,G. et al. (1993). Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. *Eur.J.Cancer*, 29A, 1573-1577.

314. Lamartiniere,C.A., Moore,J.B., Brown,N.M. et al. (1995). Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis*, 16, 2833-2840.
315. Collins,A.R. (2002). The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol.Biol.*, 203, 163-177.
316. Esterbauer,H., Schaur,R.J., Zollner,H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic.Biol.Med.*, 11, 81-128.
317. Thor,H., Smith,M.T., Hartzell,P. et al. (1982). The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J.Biol.Chem.*, 257, 12419-12425.
318. Helbock,H.J., Beckman,K.B., Shigenaga,M.K. et al. (1998). DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95, 288-293.
319. Chung,F.L., Chen,H.J., Nath,R.G. (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis*, 17, 2105-2111.
320. Jernstrom,B. and Graslund,A. (1994). Covalent binding of benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxides to DNA: molecular structures, induced mutations and biological consequences. *Biophys.Chem.*, 49, 185-199.
321. Bianco,N.R., Perry,G., Smith,M.A. et al. (2003). Functional implications of antiestrogen induction of quinone reductase: inhibition of estrogen-induced deoxyribonucleic acid damage. *Mol.Endocrinol.*, 17, 1344-1355.
322. Rajapakse,N., Butterworth,M., Kortenkamp,A. (2005). Detection of DNA strand breaks and oxidized DNA bases at the single-cell level resulting from exposure to estradiol and hydroxylated metabolites. *Environ.Mol.Mutagen.*, 45, 397-404.
323. Sierens,J., Hartley,J.A., Campbell,M.J. et al. (2001). Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat.Res*, 485, 169-176.
324. Knoll,N., Ruhe,C., Veeriah,S. et al. (2005). Genotoxicity of 4-Hydroxy-2-Nonenal in Human Colon Tumor Cells Is Associated with Cellular Levels of Glutathione and the Modulation of Glutathione S-Transferase A4 Expression by Butyrate. *Toxicol.Sci.*, 86, 27-35.
325. Hu,W., Feng,Z., Eveleigh,J. et al. (2002). The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 23, 1781-1789.
326. Schaeferhenrich,A., Beyer-Sehlmeyer,G., Festag,G. et al. (2003). Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat.Res*, 526, 19-32.
327. Banerjee,D., Madhusoodanan,U.K., Sharanabasappa,M. et al. (2003). Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine. *Clin.Chim.Acta*, 337, 147-152.
328. Harma,M., Harma,M., Erel,O. (2003). Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss.Med.Wkly.*, 133, 563-566.
329. Liegibel,U.M., Abrahamse,S.L., Pool-Zobel,B.L. et al. (2000). Application of confocal laser scanning microscopy to detect oxidative stress in human colon cells. *Free Radic.Res*, 32, 535-547.
330. Jacob,J. and Grimmer,G. (1996). Metabolism and excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat and in human. *Cent.Eur.J.Public Health*, 4 Suppl, 33-39.

331. Scherer,G., Frank,S., Riedel,K. et al. (2000). Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 9, 373-380.
332. Wilms,L.C., Hollman,P.C., Boots,A.W. et al. (2005). Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat.Res*, 582, 155-162.
333. Dong,H., Bonala,R.R., Suzuki,N. et al. (2004). Mutagenic potential of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts positioned in codon 273 of the human P53 gene. *Biochemistry*, 43, 15922-15928.
334. Spange,S. (2005). Untersuchungen zur Genotoxizität von polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen in der Adenom-Zelllinie LT97 und in primären Kolonozyten unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Butyrat. Diplomarbeit,
335. Ngo,E.O., Sun,T.P., Chang,J.Y. et al. (1991). Menadione-induced DNA damage in a human tumor cell line. *Biochem.Pharmacol.*, 42, 1961-1968.
336. Glaab,V., Collins,A.R., Eisenbrand,G. et al. (2001). DNA-damaging potential and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals. *Mutat.Res*, 497, 185-197.
337. Janzowski,C., Glaab,V., Samimi,E. et al. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chem.Toxicol.*, 38, 801-809.
338. Mobley,J.A. and Brueggemeier,R.W. (2002). Increasing the DNA damage threshold in breast cancer cells. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 180, 219-226.
339. Lewis,A.D., Forrester,L.M., Hayes,J.D. et al. (1989). Glutathione S-transferase isoenzymes in human tumours and tumour derived cell lines. *Br.J.Cancer*, 60, 327-331.
340. Fields,W.R., Li,Y., Townsend,A.J. (1994). Protection by transfected glutathione S-transferase isozymes against carcinogen-induced alkylation of cellular macromolecules in human MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, 15, 1155-1160.
341. Molina,R., Oesterreich,S., Zhou,J.L. et al. (1993). Glutathione transferase GST pi in breast tumors evaluated by three techniques. *Dis.Markers*, 11, 71-82.
342. Morrow,C.S., Chiu,J., Cowan,K.H. (1992). Posttranscriptional control of glutathione S-transferase pi gene expression in human breast cancer cells. *J.Biol.Chem.*, 267, 10544-10550.
343. Jhaveri,M.S., Stephens,T.E., Morrow,C.S. (1997). Role of posttranscriptional processes in the regulation of glutathione S-transferase P1 gene expression in human breast cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 237, 729-734.
344. Jhaveri,M.S. and Morrow,C.S. (1998). Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transferase P1 gene in human breast cancer cells. *Gene*, 210, 1-7.
345. Usami,H., Kusano,Y., Kumagai,T. et al. (2005). Selective induction of the tumor marker glutathione S-transferase P1 by proteasome inhibitors. *J.Biol.Chem.*, 280, 25267-25276.
346. Krokan,H.E., Kavli,B., Slupphaug,G. (2004). Novel aspects of macromolecular repair and relationship to human disease. *J.Mol.Med.*, 82, 280-297.
347. Cheng,T.C., Chen,S.T., Huang,C.S. et al. (2005). Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the catechol estrogen-metabolizing genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Int.J.Cancer*, 113, 345-353.

348. Dawling,S., Hachey,D.L., Roodi,N. et al. (2004). In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. *Chem.Res Toxicol.*, 17, 1258-1264.
349. Sparks,R., Ulrich,C.M., Bigler,J. et al. (2004). UDP-glucuronosyltransferase and sulfotransferase polymorphisms, sex hormone concentrations, and tumor receptor status in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 6, R488-R498.
350. Doerge,D.R., Chang,H.C., Churchwell,M.I. et al. (2000). Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.*, 28, 298-307.
351. Nakano,H., Ogura,K., Takahashi,E. et al. (2004). Regioselective monosulfation and disulfation of the phytoestrogens daidzein and genistein by human liver sulfotransferases. *Drug Metab Pharmacokinet.*, 19, 216-226.
352. Dziegiel,P. (2004). Expression of metallothioneins in tumor cells. *Pol.J.Pathol.*, 55, 3-12.
353. Cherian,M.G., Jayasurya,A., Bay,B.H. (2003). Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat.Res*, 533, 201-209.
354. Wenzel,U., Kuntz,S., Brendel,M.D. et al. (2000). Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 60, 3823-3831.
355. Vaidyanathan,J.B. and Walle,T. (2003). Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 307, 745-752.
356. Walgren,R.A., Karnaky,K.J., Jr., Lindenmayer,G.E. et al. (2000). Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 294, 830-836.
357. Walle,U.K., French,K.L., Walgren,R.A. et al. (1999). Transport of genistein-7-glucoside by human intestinal CACO-2 cells: potential role for MRP2. *Res Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.*, 103, 45-56.
358. Castro,A.F. and Altenberg,G.A. (1997). Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *Biochem.Pharmacol.*, 53, 89-93.
359. Hooijberg,J.H., Broxterman,H.J., Heijn,M. et al. (1997). Modulation by (iso)flavonoids of the ATPase activity of the multidrug resistance protein. *FEBS Lett.*, 413, 344-348.
360. Sarkar,F.H. and Li,Y. (2002). Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev.*, 21, 265-280.
361. Appelt,L.C. and Reicks,M.M. (1997). Soy feeding induces phase II enzymes in rat tissues. *Nutr.Cancer*, 28, 270-275.
362. Breinholt,V., Lauridsen,S.T., Dragsted,L.O. (1999). Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica*, 29, 1227-1240.
363. Helsby,N.A., Williams,J., Kerr,D. et al. (1997). The isoflavones equol and genistein do not induce xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse and in human cells. *Xenobiotica*, 27, 587-596.
364. Kautenburger,T., Beyer-Sehlmeyer,G., Festag,G. et al. (2005). The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells. *J.Cancer Res Clin.Oncol.*, 1-9.

365. Lampe, J.W., Chen, C., Li, S. et al. (2000). Modulation of human glutathione S-transferases by botanically defined vegetable diets. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9, 787-793.
366. Kirlin, W.G., Cai, J., DeLong, M.J. et al. (1999). Dietary compounds that induce cancer preventive phase 2 enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cells. *J. Nutr.*, 129, 1827-1835.
367. Steinkellner, H., Hoelzl, C., Uhl, M. et al. (2005). Coffee consumption induces GSTP in plasma and protects lymphocytes against (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induced DNA-damage: Results of controlled human intervention trials. *Mutat. Res.*
368. Key, T.J., Allen, N.E., Spencer, E.A. et al. (2003). Nutrition and breast cancer. *Breast*, 12, 412-416.
369. Huang, J., Tan, P.H., Thiyagarajan, J. et al. (2003). Prognostic significance of glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. *Mod. Pathol.*, 16, 558-565.
370. Zhu, C.Y. and Loft, S. (2003). Effect of chemopreventive compounds from Brassica vegetables on NAD(P)H:quinone reductase and induction of DNA strand breaks in murine hepa1c1c7 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 455-462.
371. Burdick, A.D., Davis, J.W., Liu, K.J. et al. (2003). Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res*, 63, 7825-7833.
372. Russo, J., Hu, Y.F., Tahin, Q. et al. (2001). Carcinogenicity of estrogens in human breast epithelial cells. *APMIS*, 109, 39-52.
373. Russo, J., Tahin, Q., Lareef, M.H. et al. (2002). Neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogens and chemical carcinogens. *Environ. Mol. Mutagen.*, 39, 254-263.
374. Surh, Y.J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 768-780.
375. Li, Y. and Sarkar, F.H. (2002). Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway. *Clin. Cancer Res*, 8, 2369-2377.
376. Montano, M.M. and Katzenellenbogen, B.S. (1997). The quinone reductase gene: a unique estrogen receptor-regulated gene that is activated by antiestrogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 2581-2586.
377. Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G. et al. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*, 277, 1508-1510.
378. Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G. et al. (2004). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 279, 27008-27016.
379. Duan, R., Porter, W., Safe, S. (1998). Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor Sp1 complex formation. *Endocrinology*, 139, 1981-1990.
380. Montano, M.M., Jaiswal, A.K., Katzenellenbogen, B.S. (1998). Transcriptional regulation of the human quinone reductase gene by antiestrogen-liganded estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta. *J. Biol. Chem.*, 273, 25443-25449.
381. Duan, R., Xie, W., Burghardt, R.C. et al. (2001). Estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1. *J. Biol. Chem.*, 276, 11590-11598.

382. McMahon,M., Itoh,K., Yamamoto,M. et al. (2001). The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res*, 61, 3299-3307.
383. Rushmore,T.H. and Kong,A.N. (2002). Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr.Drug Metab*, 3, 481-490.
384. Lee,J.S. and Surh,Y.J. (2005). Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.*, 224, 171-184.
385. Patten,E.J. and DeLong,M.J. (1999). Effects of sulindac, sulindac metabolites, and aspirin on the activity of detoxification enzymes in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Lett.*, 147, 95-100.
386. Jacobson,L.P., Zhang,B.C., Zhu,Y.R. et al. (1997). Oltipraz chemoprevention trial in Qidong, People's Republic of China: study design and clinical outcomes. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 6, 257-265.
387. Wang,J.S., Shen,X., He,X. et al. (1999). Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. *J.Natl.Cancer Inst*, 91, 347-354.
388. Knoll,N., Weise,A., Claussen,U. et al. (2005). 2-Dodecylcyclobutanone, a radiolytic product of palmitic acid, is genotoxic in primary human colon cells and in cells from preneoplastic lesions. *Mutat.Res*,
389. Gardner,J.L. and Gallagher,E.P. (2001). Development of a peptide antibody specific to human glutathione S-transferase alpha 4-4 (hGSTA4-4) reveals preferential localization in human liver mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.*, 390, 19-27.
390. Fields,W.R., Morrow,C.S., Doss,A.J. et al. (1998). Overexpression of stably transfected human glutathione S-transferase P1-1 protects against DNA damage by benzo[a]pyrene diol-epoxide in human T47D cells. *Mol.Pharmacol.*, 54, 298-304.
391. Robin,M.A., Prabu,S.K., Raza,H. et al. (2003). Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp70. *J.Biol.Chem.*, 278, 18960-18970.
392. Addya,S., Mullick,J., Fang,J.K. et al. (1994). Purification and characterization of a hepatic mitochondrial glutathione S-transferase exhibiting immunochemical relationship to the alpha-class of cytosolic isoenzymes. *Arch.Biochem.Biophys.*, 310, 82-88.
393. Speit,G. and Hartmann,A. (1995). The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*, 10, 555-559.
394. Hu,X., Herzog,C., Zimniak,P. et al. (1999). Differential protection against benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced DNA damage in HepG2 cells stably transfected with allelic variants of pi class human glutathione S-transferase. *Cancer Res.*, 59, 2358-2362.
395. Sundberg,K., Johansson,A.S., Stenberg,G. et al. (1998). Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*, 19, 433-436.
396. Burdette,J.E., Chen,S.N., Lu,Z.Z. et al. (2002). Black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) protects against menadione-induced DNA damage through scavenging of reactive oxygen species: bioassay-directed isolation and characterization of active principles. *J.Agric.Food Chem.*, 50, 7022-7028.

397. Murota,K., Shimizu,S., Miyamoto,S. et al. (2002). Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J.Nutr.*, 132, 1956-1961.
398. Peterson,T.G., Ji,G.P., Kirk,M. et al. (1998). Metabolism of the isoflavones genistein and biochanin A in human breast cancer cell lines. *Am.J.Clin.Nutr.*, 68, 1505S-1511S.
399. Ruefer,C. (2005). Bioverfügbarkeit, Metabolismus und biologische Aktivität von Isoflavonen und deren Metaboliten. Dissertation,
400. Hong,J., Lu,H., Meng,X. et al. (2002). Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, 62, 7241-7246.
401. Kuo,S.M. (1996). Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.*, 110, 41-48.
402. Khan,S.A., Rogers,M.A., Obando,J.A. et al. (1994). Estrogen receptor expression of benign breast epithelium and its association with breast cancer. *Cancer Res*, 54, 993-997.
403. Morito,K., Hirose,T., Kinjo,J. et al. (2001). Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol.Pharm.Bull.*, 24, 351-356.
404. Markaverich,B.M., Roberts,R.R., Alejandro,M.A. et al. (1988). Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and cell growth inhibition. *J.Steroid Biochem.*, 30, 71-78.
405. Scambia,G., Ranelletti,F.O., Panici,P.B. et al. (1993). Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines. *Int.J.Cancer*, 54, 462-466.
406. Chen,J., Lin,H., Hu,M. (2005). Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 55, 159-169.
407. Murrill,W.B., Brown,N.M., Zhang,J.X. et al. (1996). Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis*, 17, 1451-1457.
408. Hilakivi-Clarke,L., Onojafe,I., Raygada,M. et al. (1999). Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis. *Br.J.Cancer*, 80, 1682-1688.
409. Lamartiniere,C.A. (2002). Timing of exposure and mammary cancer risk. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, 7, 67-76.
410. Kroon,P.A., Clifford,M.N., Crozier,A. et al. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J.Clin.Nutr.*, 80, 15-21.

ANHANG I: CHEMIKALIEN, GERÄTE, LÖSUNGEN UND PUFFER

Geräte

Analysenwaage (Sartorius Basic plus)	Sartorius AG, Göttingen
Bildauswertungssystem (KOMET 4.0)	Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK
BioRad-Multimanagers	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Brutschrank (Steri Cult 200)	Forma Scientific, Inc.
CCD Kamera (LAS 1000)	Fuji über Raytest, Straubenhardt
Elektronikrührer (Monotherm variomag)	H+P Labortechnik GmbH, München
Elektrophoreseeinheit (Consort E831)	cti GmbH, Idstein/Taunus
Elektrophoreseeinheit (Power Pack P25)	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer, horizontal	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer, vertikal	cti GmbH, Idstein/Taunus
Fluoreszenz-Mikroskop (Axiolab HB50)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Fotokassette	rego GmbH, Augsburg
Gelgießstand	cti GmbH, Idstein/Taunus
Konfokales Fluoreszenzmikroskop (Axiovert M100)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikrowellengerät (HMT 700B)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH
Minischüttler (MS1 Minishaker)	IKA-Werke, Staufen
MTP-Fluoreszenz-Photometer (SpectralFluor Plus)	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Real-Time PCR Gene-Amp 5700 SDS	Applied Biosystems, Warrington, UK
SLT Rainbow MTP Reader	Alpha, Larne, Northern Ireland
SemiDry Blotter	cti GmbH, Idstein/Taunus
Sequenzierer Genetic Analyzer 3100	Applied Biosystems, Warrington, UK
Sterile Werkbank (Herasafe H12)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer (Compact)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Tischzentrifuge (CR 4.22)	Jouan GmbH, Hanau
Titan-Ultraschall-Homogenisator Sonoplus	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter GmbH, München
UV-Vis-Spektrophotometer Cary 3 E	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Wärmeplatte (HP 9060)	Labotect GmbH, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wippe (Duomax 1030)	Heidolph GmbH & Co. KG, Schwabach
Zentrifuge (biofuge fresco)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge (biofuge pico)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Arbeitsmittel

Deckgläser (24 x 24 mm; 24 x 70 mm)	Menzel, Braunschweig
Einweg-Pipetten (2 ml – 50 ml)	Fisher Scientific, Schwerte
Filme (Hyperfilm ECL)	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Filterpapier (Gel-Blotting-Papier GB 004)	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Handstückzähler	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Mehrkanal-Luftpolsterpipette (Transferpipette)	Brand GmbH & Co., Wertheim
Mikrotiterplatten (96 well), 6-well-Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Nitrozellulosetransfermembran (PROTRAN®)	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Objektträger (einseitig aufgeraut)	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten (steril)	NeoLab, Heidelberg
Pipetten (0,2 µl – 2000 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen filter tip Gel 100	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Pipettierhilfe (accu-jet)	Brand GmbH & Co., Wertheim
Präzisionsküvetten aus UV-Quarzglas	Hellma Optik GmbH, Jena
Reaktionsgefäße (0,2 - 2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)
 SLG Filterspitzen
 Zellkulturflaschen (25 cm²; 75 cm²)
 Zellschaber, steril
 Zellzählkammer nach Neubauer (geeicht)

Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
 Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
 Becton Dickinson Labware, Heidelberg
 Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
 Fisher Scientific, Schwerte

Chemikalien und Reagenzien

Agarose, NuSieve 3:1
 Agarose, Sea Plaque GTG (low melting)
 Agarose, SEAKEM HGT
 Benzo(a)pyren
 Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid

Biozym Diagnostics, Hameln
 Biozym Diagnostics, Hameln
 Biozym Diagnostics, Hameln
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Biochemisches Institut für Umweltkarzi-
 nogene, Grosshansdorf
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
 Biological Industries, Israel
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Biotin
 Charcoal-stripped FCS
 Cholera toxin
 CDP-Star
 Daidzein
 4',6-Diamidino-2'-phenylindol (DAPI)
 Dihydrodaidzein
 Dihydrogenistein
 DNA-Leiter 100 bp
 dNTP-Mix [100 mM]
 Dulbecco's Modified Eagle Medium
 Enhanced Chemifluorescence (ECF)TM
 Enhanced Chemiluminescence (ECL)TM
 Enterodiol
 Enterolacton
 Equol
 17β-Estradiol
 2-Hydroxy-Estradiol
 4-Hydroxy-Estradiol
 Fetales Kälberserum (FCS)
 Formaldehyd
 Genistein
 HotStarTaq-Polymerase [5 units/μl]
 4-Hydroxy-2-nonenal
 6-Hydroxy-*O*-Desmethylangolensin

TCI Tokyo Kasei, Japan
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Plantech, Reading, UK
 Plantech, Reading, UK
 peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
 STRATAGENE, Amsterdam Zuidooost
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 Amersham Biosciences Europe, Freiburg
 Amersham Biosciences Europe, Freiburg
 Fluka, Buchs, Schweiz
 Fluka, Buchs, Schweiz
 Fluka, Buchs, Schweiz
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 ICN Biomedicals, Irvine, USA
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
 TCI Tokyo Kasei, Japan
 QIAGEN GmbH, Hilden
 Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
 Kristiina Wähälä, University of Helsinki,
 Finnland

Lachsspermien DNA (10 mg/ml)
 Ladepuffer [6x]
 Mammary Epithelial Basal Medium (phenolrotfrei)
 Mammary Epithelial Growth Medium
 Menadione
 Milchpulver (Non-Fat-Dry-Milk)
 Nichtessentielle Aminosäuren
O-Desmethylangolensin
 PCR Puffer [10x] (15 mM MgCl₂)
 PenStrep (5000 U/ml Penicillin G, 5 g/ml Streptomycin-
 Sulfat in 0,9 % NaCl-Lösung)
 Primer (RT-PCR)
 Primer (real-time RT-PCR)
 Rainbow-Marker
 Restriktionsverdau *A*/w 26 I
 Rinderserum-Albumin
 RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)

Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
 Promocell GmbH, Heidelberg
 Promocell GmbH, Heidelberg
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Bio-Rad Laboratories GmbH, München
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 Plantech, Reading, UK
 Quiagen GmbH, Hilden
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 MWG Biotech AG, Ebersberg
 Invitrogen, Cambridge, UK
 Amersham Biosciences Europe, Freiburg
 Promega, Madison, USA
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 Gibco, Eggenstein

S-Equol	Plantech, Reading, UK
TaqMan RT-Reagents	Applied Biosystems, Warrington, UK
TaqMan Sonden (real-time RT-PCR)	Applied Biosystems Warrington, UK
TaqMan Universal Mastermix	Applied Biosystems, Warrington, UK
TRIzol®-Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin (10x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 % (w/v))	Biochrom AG, Berlin
Ziegen-Normalserum	dianova GmbH, Hamburg

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Merck, Darmstadt, Sigma-Aldrich, Steinheim bzw. Carl Roth, Karlsruhe bezogen.

Antikörper und Standardproteine

Anti-EP-CAM; Klon Ber-EP4	DAKO, Hamburg
Anti-Thy1/CD90 (FIB1; Klon AS02)	dianova GmbH, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgG-Cy3	dianova GmbH, Hamburg
Chicken anti-hGSTA4 peptide antibody	E.P. Gallagher, University of Washington, USA
Goat anti-chicken IgY-HRP	Santa Cruz Biotechnology, USA
Goat anti-hNQO1 peptide antibody	Santa Cruz Biotechnology, USA
GST-Antikörper (monoklonal, mouse anti hGST)	W.H.M. Peters, University Hospital St. Rasboud, Nijmegen, Niederlande
GST- Standardproteine, GSTA1, GSTP1 GSTM1	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden W.H.M. Peters, University Hospital St. Rasboud, Nijmegen, Niederlande
Rabbit anti-goat IgG-AP	DAKO, Hamburg
Rabbit anti mouse-immunglobulins-HRP	DAKO, Hamburg

Kits

Cell Proliferation ELISA, BrdU (Chemiluminescence)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CellTiter-Blue®	Promega Southampton, UK
Glutathione Assay Kit	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
MTT Assay	Promega, Southampton, UK

Medien, Lösungen und Puffer

Die im Folgenden beschriebenen Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt und, soweit nicht anders angegeben, bei 4°C gelagert.

ZELLKULTUR

MCF-7 Zellkulturmedium (DMEM + 10 % FCS + 1 % Nichtessentielle Aminosäuren + 1 % Pen-Strep)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).....	450 ml
Fetales Kälberserum (FCS).....	50 ml
Nichtessentielle Aminosäuren	5 ml
PenStrep.....	5 ml

MCF-10A Zellkulturmedium (MEGM + Choleratoxin)

Mammary Epithelial Growth Medium.....	500ml
Choleratoxin.....	100 ng/ml

MCF-7 Versuchsmedium (Phenolrotfrei)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM phenolrotfrei).....	450 ml
Fetales Kälberserum (FCS bzw. CCS).....	50 ml
Nichtessentielle Aminosäuren	5 ml
L-Glutamin (200 mM)	5 ml

PenStrep 5 ml

MCF-10A Versuchsmedium (Phenolrotfrei)

Mammary Epithelial Basal Medium 500ml
 Supplement Kit
 Cholera toxin 100 ng/ml

Phosphate Buffered Saline (PBS)

NaCl 137 mM
 KCL 2,7 mM
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 8,1 mM
 KH_2PO_4 1,5 mM
 pH 7,3 (mit 1N NaOH eingestellt); autoklaviert

PBS + Ca^{2+} + Mg^{2+}

$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0,13 g/l PBS
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,10 g/l PBS
 pH 7,3; steril filtriert

PBS + Ca^{2+} + Mg^{2+} + BSA [0,5 %]

BSA 5 g/l PBS + Ca^{2+} + Mg^{2+}
 pH 7,3; steril filtriert
 Na_2EDTA 1,86 g/l PBS
 pH 7,4; steril filtriert

ZYTOSOLEXTRAKTION / GST-AKTIVITÄT / PROTEINBESTIMMUNG

Homogenisationspuffer

Tris-HCl 25 mM
 Saccharose 250 mM
 Na_2EDTA 1 mM
 Pefabloc (Zugabe nach Einstellen des pH-Wertes) 1 mM
 pH 7,8 (mit 1N NaOH oder 2N HCl eingestellt)

IB-Homogenisationspuffer

Tris 20 mM
 Saccharose 250 mM
 Dithiothreitol 1 mM
 Pefabloc (Zugabe nach Einstellen des pH-Wertes) 1 mM
 pH 7,4 (mit 2 N HCl eingestellt)

Phosphatpuffer [0,1 M]

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Lösung 1) 0,1 M
 K_2HPO_4 (Lösung 2) 0,1 M
 pH 6,5 (durch Titrieren der Lösung 1 mit Lösung 2 eingestellt); autoklaviert

CDNB-Stammlösung [20 mM]

CDNB 40,5 g
 Ethanol absolut 10 ml
 Vor Gebrauch bei RT 1:5 mit Phosphatpuffer verdünnen.

Glutathion-Lösung [4 mM]

Glutathion 30,7 mg
 Phosphatpuffer [0,1 M] 25 ml
 Lagerung: aliquotiert bei -20°C

BRADFORD-Farbreagenz

Coomassie Brilliant Blau G	50 mg
Ethanol absolut	23,5 ml
Phosphorsäure	50 ml
unter Rühren (mindestens 3 Stunden) lösen	
H ₂ O	ad 500 ml
filtriert, Lagerung: lichtgeschützt	

BSA-Stammlösung [1 % (w/v)]

BSA	50 mg
Homogenisationspuffer	5 ml
steril filtriert; Lagerung: aliquotiert bei -20 °C	

WESTERN BLOT**Puffer für Trenngel**

Tris	1,5 M
pH 8,8 (mit konz. HCl eingestellt)	

Puffer für Sammelgel

Tris	0,5 M
pH 6,8 (mit konz. HCl eingestellt)	

Stammpuffer für Elektrophorese und Blotting [10x]

Tris	250 mM
Glycin	1,92 M
pH » 8,8	

Sodiumdodecylsulfat (SDS) -Lösung [10 % (w/v)]

SDS	10 g
H ₂ O	ad 100 ml
Lagerung: RT	

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung [10 % (w/v)]

APS	500 mg
H ₂ O	ad 5 ml
Lagerung: aliquotiert bei -20 °C	

Tris-Puffer [20 mM]

Tris	20 mM
pH 7,4 (mit 2N HCl eingestellt), steril filtriert	

Trenngel [12 % Acrylamid / Bisacrylamid] (Mengen für 2 kleine Gele)

H ₂ O.	4,935 ml
Puffer für Trenngel	3,75 ml
Monomer (Rotiphorese Gel 30) [30 %]	6 ml
SDS [10 %]	150 µl
APS [10 %]	150 µl
TEMED	15 µl
Reagenzien der Reihenfolge nach pipettieren, nach TEMED-Zugabe gut mischen und sofort die Gele gießen, Gele mit H ₂ O überschichten; Polymerisationsdauer: 10-15 min	

Sammelgel [3 % Acrylamid / Bisacrylamid] (Mengen für 2 kleine Gele)

H ₂ O.	3,05 ml
Puffer für Trenngel	1,2 ml
Monomer (Rotiphorese Gel 30) [30 %]	650 µl

SDS [10 %]	50 µl
APS [10 %]	50 µl
TEMED	10 µl
Reagenzien der Reihenfolge nach pipettieren, nach TEMED-Zugabe gut mischen und sofort die Gele auf die polymerisierten Trenngele gießen; Polymerisationsdauer: 15-20 min	

SDS-PAGE-Ladepuffer (Probenpuffer)

Puffer für Sammelgel [0,5 M Tris]	2,5 ml
SDS [10 %]	2 ml
Glycerol [99 %]	1 ml
Harnstoff	3,6 g
Bromphenolblau	10 mg
DTT	500 mg
H ₂ O	ad 10 ml
Lagerung: aliquotiert bei -20 °C	

Elektrophoresepuffer

Stammpuffer für Elektrophorese/Blotting [10x]	15 ml
SDS [10 %]	1,5 ml
H ₂ O	ad 150 ml

Transferpuffer (Blottingpuffer) [5 % Methanol]

Stammpuffer für Elektrophorese/Blotting [10x]	100 ml
H ₂ O	850 ml
Methanol	50 ml

Gelfärbelösung

Coomassie Blau G 250	0,2 g
Methanol	90 ml
Essigsäure	20 ml
unter Rühren (mindestens 3 Stunden) lösen	
H ₂ O	ad 200 ml
filtriert, Lagerung: lichtgeschützt	

Tris Buffered Saline (TBS) [10x]

Tris-HCl	160 mM
Tris	40 mM
NaCl	1,37 M
pH 7,4 (mit konz. HCl eingestellt); autoklaviert; Lagerung: RT	

TBS Tween (TBST)

TBS [10x]	100 ml
H ₂ O	900 ml
Tween 20	0,5 ml
Lagerung: RT (1 Woche)	

Blockingpuffer mit 5 % (w/v) Milchpulver

Milchpulver	50 g
TBST	1 l
Lagerung: -20 °C	

3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Stammlösung

DAB Tetrahydrochlorid	450 mg
PBS	9 ml
Lagerung: aliquotiert bei -20 °C	

DAB-Substratlösung

PBS	29,7 ml
DAB-Stammlösung.....	300 µl
Cobaltchlorid	1 kl. Spatelspitze (ca. 3 mg)
Imidazol	1 kl. Spatelspitze (ca. 1 mg)
H ₂ O ₂ [30 % v/v]	5 µl
Kurz vor Gebrauch hergestellt.	

NQO1-AKTIVITÄT**Lyselösung**

Digitonin	1,6 mg
EDTA	116,8 mg
H ₂ O	200 ml
Lagerung: RT	

Reaktionslösung

Tris-HCl (0,5 M)	0,75 ml
Tween-20 (1,5 % (v/v))	0,1 ml
FAD (7,5 mM)	10 µl
NADP (50 mM)	9 µl
Glukose 6-phosphat (150 mM)	0,1 ml
BSA (7,5 % (v/v))	0,133 ml
Glukose 6-phosphat Dehydrogenase (1000 U/0,3 ml)	9 µl
MTT	4,5 mg
H ₂ O	13,883 ml
Menadion (50 mM)	15 µl
Kurz vor Gebrauch hergestellt.	

Stopplösung

Kaliumphosphat (5 mM)	3,8 ml
Dicumarol (0,3 mM)	0,2 ml
Lagerung: RT	

MULTIPLEX-PCR / RT-PCR**Tris-Acetat EDTA (TAE)-Puffer [50x]**

Tris	2 M
EDTA	50 mM
Essigsäure	5,72 % (v/v)
pH 8,3 (mit 1N NaOH oder Essigsäure eingestellt); Lagerung: RT	

TAE-Puffer [1x]

TAE-Puffer [50x]	20 ml
H ₂ O	980 ml
pH 8,3; Lagerung: RT	

Dimethylpyrocarbonat (DMPC)-Lösung [1% (v/v)]

Ethanol absolut	495 ml
H ₂ O	495 ml
DMPC	10 ml

DMPC-Wasser

DMPC-Lösung [1 %]	100 ml
H ₂ O	900 ml
30 min bei RT inkubiert; autoklaviert; Lagerung: RT	

4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)-Puffer (10x)

MOPS	41,86 g
Na-Acetat	4,102 g
Na ₂ EDTA	3,722 g
DMPC-H ₂ O	ad 1 l
pH 7,0 (mit Essigsäure oder 1N NaOH eingestellt); autoklaviert; Lagerung: RT	

MOPS-Puffer (1x)

MOPS-Puffer (10x)	10 % (v/v)
mit DMPC-H ₂ O verdünnt; Lagerung: RT	

Lithiumchlorid-Lösung

LiCl	4 M
mit DMPC-H ₂ O hergestellt, Lagerung: RT	

RNA-Auftragspuffer (Stammlösung)

Bromphenolblau	0,07 % (w/v)
SDS	7 % (w/v)
Glycerin	33 % (v/v)

RNA-Auftragspuffer (Gebrauchslösung)

MOPS-Puffer (10x)	3,6 µl
Formaldehyd [37,6 %]	6,4 µl
Formamid	18 µl
RNA-Auftragspuffer (Stammlösung)	4 µl
Ethidiumbromid-Lösung [10 mg/ml]	0,2 µl
Kurz vor Gebrauch hergestellt.	

Agarosen

Agarose in 1xTAE	1 % bzw. 2 % (w/v)
Agarose in 1xMOPS	1,5 % (w/v)

FLUORESCENZFARBSTOFFE**DAPI-Stammlösung (3mM)**

DAPI	10,5 mg
Methanol	10 ml
Lagerung: dunkel bei -20°C, Gebrauchslösung (20 µM) direkt vor Gebrauch herstellen	

Tris-EDTA-Puffer

Tris-HCl	10 mmol/l
EDTA	1 mmol/l
pH 8,0, autoklaviert	

DABCO-Antifade

DABCO	2,5 g
Tris-EDTA-Puffer	50 ml
Glycerol	50 ml
Lagerung: dunkel bei -20°C	

SYBRGreen-Gebrauchslösung

SYBRGreen (10.000x).....	10 µl
DABCO Antifade	10 ml
Lagerung: dunkel bei –20°C	

COMET-ASSAY**Lyselösung (Stammlösung)**

NaCl.....	2,5 M
Na ₂ EDTA.....	100 mM
Tris.....	10 mM
pH 10 (mit 1N NaOH eingestellt)	
Na-Lauroylsarcosinat.....	10 g
steril filtriert; Lagerung: RT	

Lyselösung (Gebrauchslösung)

Lyse-Stammlösung	356 ml
DMSO.....	40 ml
Triton X-100	4 ml
Gebrauchslösung jeweils frisch angesetzt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.	

Elektrophoresepuffer

NaOH [10 N]	60 ml
Na ₂ EDTA [200 mM].....	10 ml
H ₂ O	ad 2 l
pH 13; Gebrauchslösung frisch angesetzt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.	

Neutralisationspuffer

Tris-Base.....	0,4 M
pH 7,5 (mit konzentrierter HCl eingestellt); steril filtriert; Lagerung: RT	

Agarosen

LMA (Sea Plaque GTG Agarose).....	0,7 % (w/v)
NMA (SEAKEM HGT Agarose).....	0,5 % (w/v)
in PBS hergestellt	

Mess- und Auswertungsssoftware

AIDA Image Analyzer	Fujifilm über Raytest, Straubenhardt
CaryWin UV Bio 2.0	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Chromas 2 version 2.3	http://www.technelysium.com.au
KOMET 4.0	Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK
EasyWin Curve Fitting V 4.0a	Tecan AG, Crailsheim
GraphPad PRISM® 2.0 und 3.02	GraphPad Software, San Diego, USA
Meta View Imaging Software	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
X-Fluor	Tecan AG, Crailsheim
Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

ANHANG II: TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabelle 9.1: Verwendete GST Primersequenzen und ihre Produktgröße

Primer		Sequenz	Produkt
GSTA1	forward	5'-agc cca agc tcc act act tca atg c-3'	515 bp
	reverse	5'-gat aag act gga gtc aag ctc ctc g-3'	
GSTA2	forward	5'-gcc caa gct cca cta ctc caa tat-3'	514 bp
	reverse	5'-aat aag gct aga gtc aag ctc ttc c-3'	
GSTA4	forward	5'-ccg gat gga gtc cgt gag atg g-3'	579 bp
	reverse	5'-gga ggc ttc ttc ttg ctg cca gg-3'	
GSTM1	forward	5'-gaa ctc cct gaa aag cta aag c-3'	215 bp
	reverse	5'-ctt ggg ctc aaa tat acg gtg g-3'	
GSTM2	forward	5'-agc cgt atg cag ctg gcc aaa c-3'	247 bp
	reverse	5'-caa atc ggg aga tga agt cct tc-3'	
GSTP1	forward	5'-acc cca ggg ctc tat ggg aa-3'	176 bp
	reverse	5'-tga ggg cac aag aag ccc ct-3'	
GSTT1	forward	5'-ctg gag ctc tac ctg gac ctg c-3'	310 bp
	reverse	5'-gag tcg tgt gct gcc atg cca g-3'	
GSTT2	forward	5'-ggt gga acg caa cag gac tgc c-3'	312 bp
	reverse	5'-gcc tga tag gcc tct ggt gag g-3'	
β -actin	forward	5'-gct cgt cgt cga caa cgg ctc-3'	337 bp
	reverse	5'-tgg gtc atc ttc tgg cgg ttg g-3'	

Tabelle 9.2: Primersequenzen zum Nachweis des *hGSTM1*- und *hGSTT1*-Genotypes

Primer		Sequenz	Produkt
GSTM1	forward	5'-gaa ctc cct gaa aag cta aag c-3'	215 bp
	reverse	5'-gtt ggg ctc aaa tat acg gtg g-3'	
GSTT1	forward	5'-ttc ctt act ggt cct cac act tc-3'	480 bp
	reverse	5'-tca ccg gat cat ggc cag ca-3'	
β -Globin	forward	5'-caa ctt cat cca cgt tca cc-3'	268 bp
	reverse	5'-gaa gag cca agg aca ggt ac-3'	

Tabelle 9.3: Primersequenzen zum Nachweis des *hGSTP1* Polymorphismus

Primer		Sequenz	Produkt
GSTP1	forward	5'-acc cca ggg ctc tat ggg aa-3'	176 bp
	reverse	5'-tga ggg cac aag aag ccc ct-3'	
β -Globin	forward	5'-caa ctt cat cca cgt tca cc-3'	268 bp
	reverse	5'-gaa gag cca agg aca ggt ac-3'	

Tabelle 9.4: Übersicht der auf den cDNA Arrays enthaltenen Gengruppen

Human Drug Metabolism Gene Array (HS11)	
Phase I Metabolizing Enzymes	P450 Gene Family
Phase II Metabolizing Enzymes	Acetyltransferases, Epoxidhydrolases, Glutathione S-Transferases, Methyltransferases, Sulfotransferases, UDP Glycosyltransferases
Drug Transporters	Metallothionines, P-Glycoprotein Family
Human Stress & Toxicity PathwayFinder Gene Array (HS12)	
Proliferation	
Growth Arrest / Senescence	
Inflammation	
Necrosis / Apoptosis	Oxidative & Metabolic Stress, Heating Stress, DNA damage & Repair, Apoptosis Signalling

Tabelle 9.5: Verwendete Primersequenzen für die real-time RT-PCR

Primer und Sonden		Sequenz	Produkt
GSTA4	forward	5'-gga tct gct gga act gct tat cat-3'	85 bp
	reverse	5'-tgt ccg tga ccc ctt aaa atc tt-3'	
	Sonde	5'-cct ttc tta aaa cca gat gat cag caa aag gaa g-3'	
GSTP1	forward	5'-ctc act cca age ctc ctg cct at-3'	135 bp
	reverse	5'-cag gat ggt att gga ctg gta cag-3'	
	Sonde	5'-tcc cca agt tcc agg acg gag acc t-3'	
NQO1	forward	5'-atc gta ctg gct cac tca gag a-3'	127 bp
	reverse	5'-tgg gat tga agt tca tgg cat aga-3'	
	Sonde	5'-ega ctc cac cac ctc cca tcc ttt ctt ctt-3'	

Zu 4.1: Charakterisierung der humanen Mammazelllinien

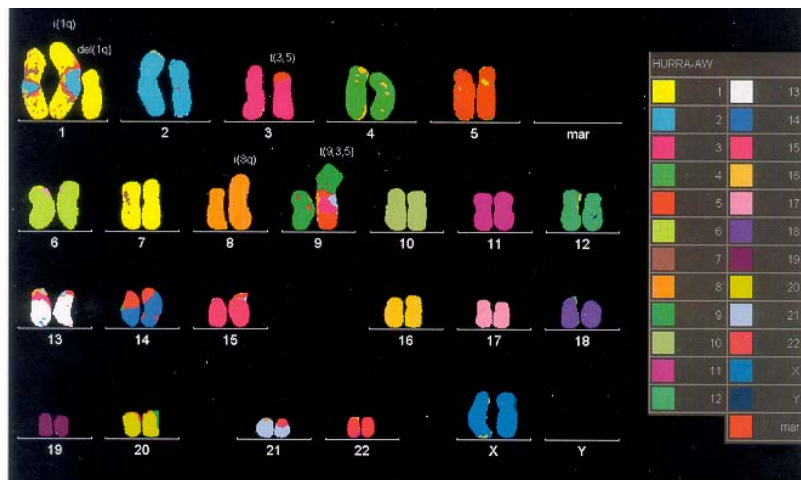


Abbildung 9.1: Karyogramm der MCF-10A Zelllinie

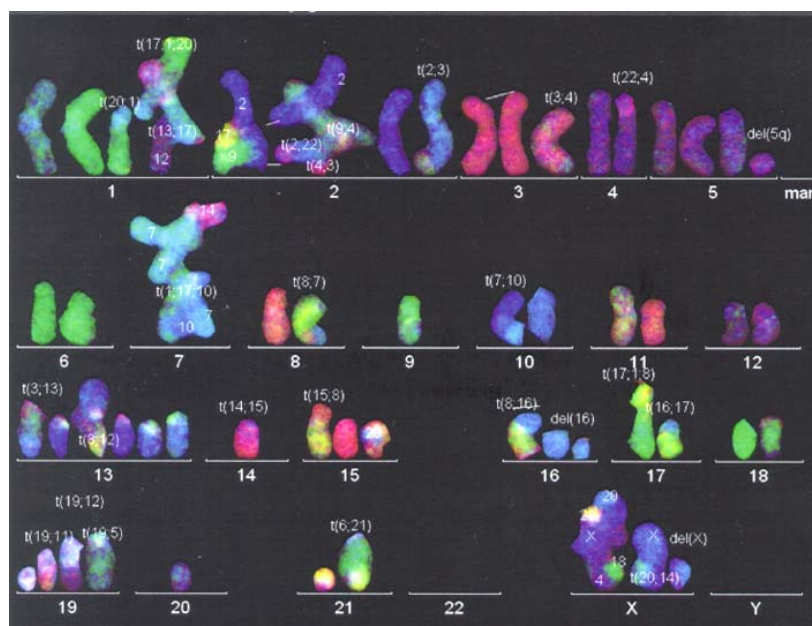


Abbildung 9.2: Karyogramm der MCF-7 Zelllinie

Zu 4.2: Untersuchungen zur Phytoestrogen-Wirkung in Mammazellen unterschiedlichen Transformationsgrades

Tabelle 9.6: Signifikante Modulation des Brustzellwachstums (DAPI)

Substanz	MCF-10A			MCF-7		
	t24	t48	t72	t24	t48	t72
Isoflavone						
GEN	20-80 µM ↓	20-80 µM ↓	10-80 µM ↓	10 µM ↑	0,1-10 µM ↑ 80 µM ↓	0,1-20 µM ↑
DHGEN	40-80 µM ↓	80 µM ↓	40-80 µM ↓	-	5-10 µM ↑	80 µM ↑
6-OH- <i>O</i> -DMA	80 µM ↓	80 µM ↓	80 µM ↓	-	10-20 µM ↑	10-20 µM ↑
DAI	80 µM ↓	80 µM ↓	80 µM ↓	-	5 µM ↑	1-10 µM ↑
DHDAI	-	-	-	-	5, 20, 80 µM ↑	-
<i>O</i> -DMA	80 µM ↓	80 µM ↓	80 µM ↓	-	5-20 µM ↑	5, 20 µM ↑
EQU	20-80 µM ↓	20-80 µM ↓	40-80 µM ↓	-	1 µM ↑ 80 µM ↓	0,1-10 µM ↑ 80 µM ↓
S-EQU	-	50 µM ↓	-	-	-	0,1-40 µM ↑
Mix (EQU)	10-50 µM ↓	10-50 µM ↓	10-50 µM ↓	-	0,1-20 µM ↑	0,1-40 µM ↑
Mix (S-EQU)	10-50 µM ↓	10-50 µM ↓	20-50 µM ↓	-	0,1-5 µM ↑	1-20 µM ↑
Lignane						
ENL	80 µM ↓	-	80 µM ↓	-	10 µM ↑ 80 µM ↓	5-40 µM ↑ 80 µM ↓
END	80 µM ↓	-	80 µM ↓	-	-	-
Estrogene						
E2	20-80 µM ↓	20-80 µM ↓	20-80 µM ↓	1 µM ↑ 40-80 µM ↓	20-80 µM ↓	1 µM ↑ 20-80 µM ↓
2-OH-E2	10-80 µM ↓	5-80 µM ↓	5-80 µM ↓	5-80 µM ↓	5-80 µM ↓	1-80 µM ↓
4-OH-E2	5-80 µM ↓	10-80 µM ↓	20-80 µM ↓	40-80 µM ↓	20-80 µM ↓	20-80 µM ↓

↑, Wachstumserhöhung; ↓, Wachstumsverminderung; -, kein Effekt.

Tabelle 9.7: Ermittelte EC₅₀-Konzentrationen (µM) für die Testsubstanzen in MCF-10A und MCF-7 Zellen

Substanz	MCF-10A			MCF-7		
	t24	t48	t72	t24	t48	t72
Isoflavone						
GEN	37	35	16	-	-	-
GEN (FCS)	n.b.	n.b.	n.b.	-	71	68
DHGEN	-	73	53	-	-	-
6-OH-O-DMA	-	-	80	-	-	-
DAI	-	-	-	-	-	-
DAI (FCS)	n.b.	n.b.	n.b.	-	-	-
DHDAI	-	-	-	-	-	-
O-DMA	-	-	-	-	-	-
EQU	-	45	42	-	-	-
S-EQU	-	-	-	-	-	-
Mix (EQU)	50	42	33	-	-	-
Mix (S-EQU)	-	-	-	-	-	-
Lignane						
ENL	-	-	-	-	24	16
ENL (FCS)	n.b.	n.b.	n.b.	-	-	-
END	-	-	-	-	-	79
END (FCS)	n.b.	n.b.	n.b.	-	-	-
Estrogene						
E2	58	43	34	-	34	29
2-OH-E2	12	17	10	24	5	3
4-OH-E2	20	17	22	55	28	32

-, EC₅₀ nicht erreicht; n.b. nicht bestimmt.

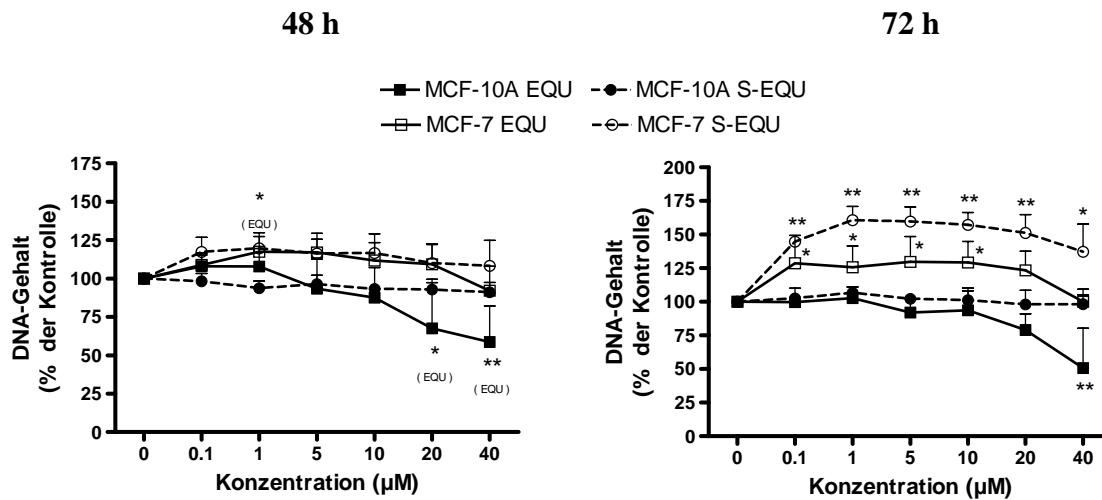


Abbildung 9.3: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit EQU und S-EQU nach 48 h und 72 h

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW \pm SD, n \geq 3 (MCF-10A), n \geq 3 (MCF-7), *p<0,05, **p<0,01, signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni Posttest.

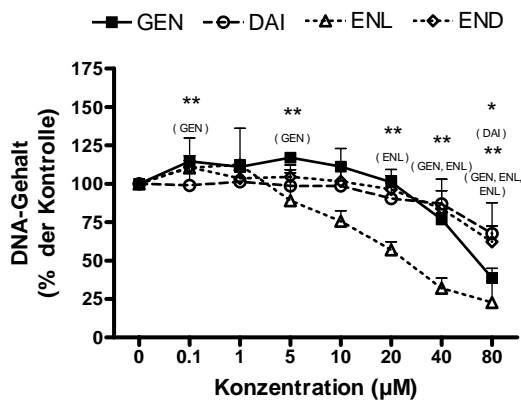


Abbildung 9.4: Zellquantifizierung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in MCF-7 nach Inkubation mit GEN, DAI, ENL und END in FCS-haltigen Medium nach 48 h

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW \pm SD, n = 4 (GEN), n = 3 (DAI), n = 3 (ENL), n = 4 (END), *p<0,05, **p<0,01, signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni Posttest.

Tabelle 9.8: Signifikante Modulation des Brustzellwachstums (BrdU)

Substanz	MCF-10A			MCF-7		
	t24	t48	t72	t24	t48	t72
Isoflavone						
GEN	10-80 μM ↓	20-80 μM ↓	-	40-80 μM ↓	40-80 μM ↓	40-80 μM ↓
EQU	20-80 μM ↓	40-80 μM ↓	-	40-80 μM ↓	10-80 μM ↓	5-80 μM ↓
Estrogene						
E2	20-80 μM ↓	20-80 μM ↓	80 μM ↓	20-80 μM ↓	10-80 μM ↓	1-80 μM ↓

-, kein Effekt; ↓, Wachstumsverminderung.

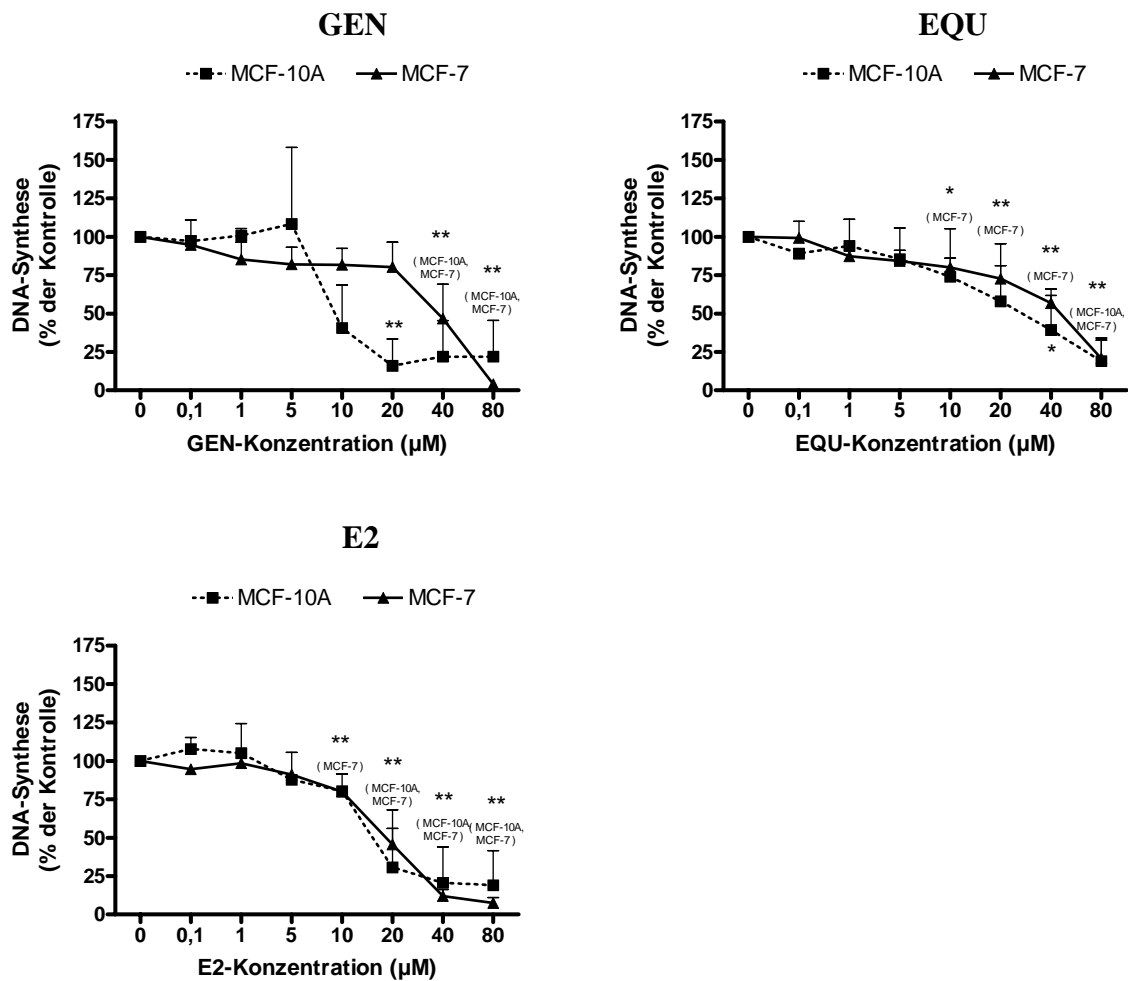


Abbildung 9.5: BrdU-Einbau als Maß für die DNA-Synthese in MCF-10A und MCF-7 nach Inkubation mit GEN, EQU und E2 nach 48 h

Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW \pm SD, n = 3 (MCF-10A), n \geq 3 (MCF-7), *p<0,05, **p<0,01, signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni Posttest.

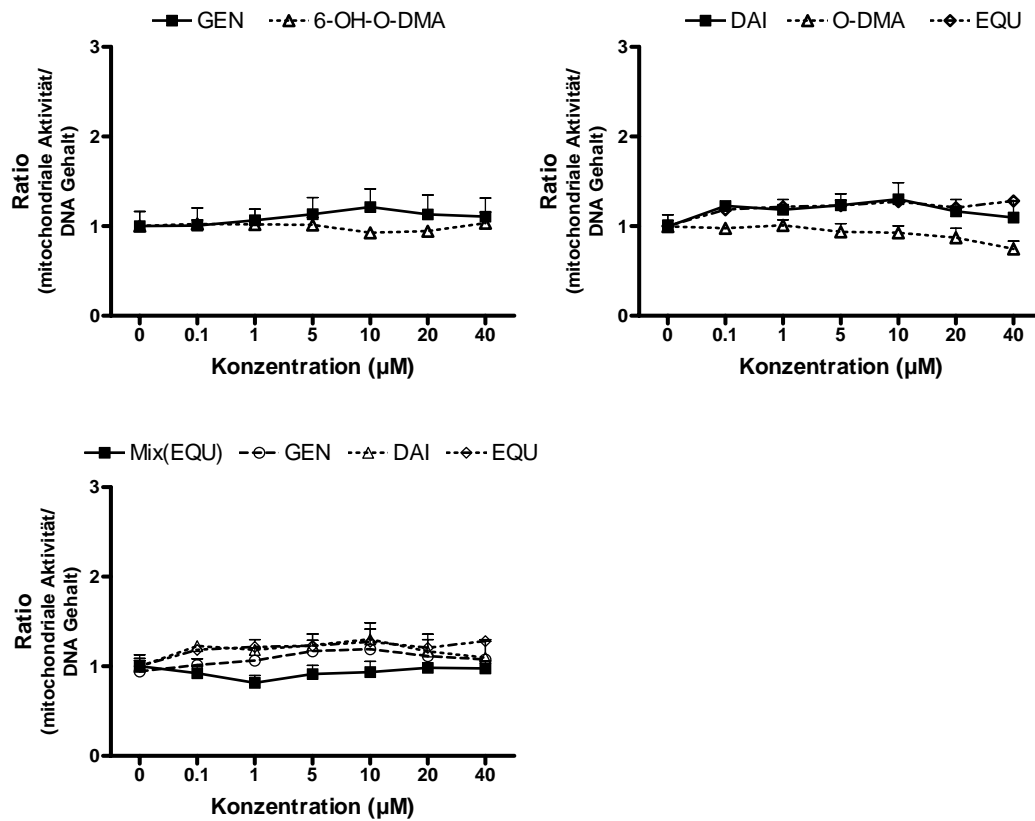


Abbildung 9.6: Mitochondriale Aktivität in MCF-7 nach Inkubation mit Isoflavonen und Mix(EQU) nach 48 h

Die Ergebnisse sind als das Verhältnis von metabolischer Aktivität zum DNA-Gehalt dargestellt, $MW \pm SD$, $n \geq 3$ (Isoflavone und Mix(EQU)), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, signifikant in One-way ANOVA mit Dunnett's Post Test.

Zu 4.3: Untersuchungen zur Genotoxizität potenzieller Brustkrebs-Risikofaktoren in humanen Mammazellen

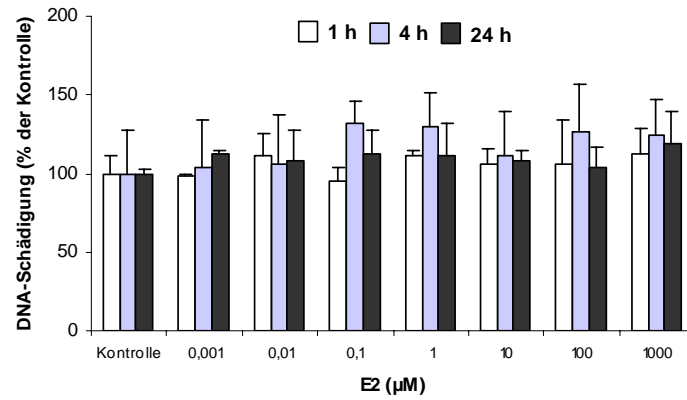


Abbildung 9.7: Induktion von DNA-Schäden in MCF-7 Zellen nach Inkubation mit E2 nach 1 h, 4 h, 24 h
Die Ergebnisse sind relativ zur jeweiligen Kontrolle (=100 %) dargestellt, MW \pm SD, n = 3.

Zu 4.4: Differenzielle Expression Fremdstoff-metabolisierender und oxidativer Stress-assoziierter Enzymsysteme

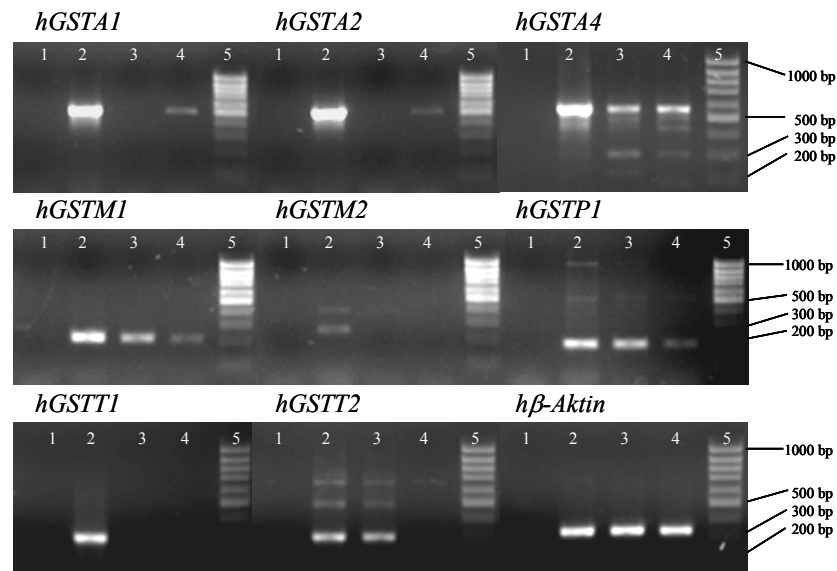


Abbildung 9.8: PCR-Analyse zum Nachweis der Basalexpression der zytosolischen GSTs in MCF-10A und MCF-7

Es wurde mRNA von MCF-10A (Spur 3) und MCF-7 (Spur 4) Zellen untersucht. Zum Längenvergleich diente eine 100 bp-DNA-Leiter (Spur 5), als Negativkontrolle H₂O (Spur 1) und als Positivkontrolle die mRNA von HT29 Zellen (Spur 2). Als interne Kontrolle wurde das Gen für β -Aktin mit amplifiziert. Die Proben wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

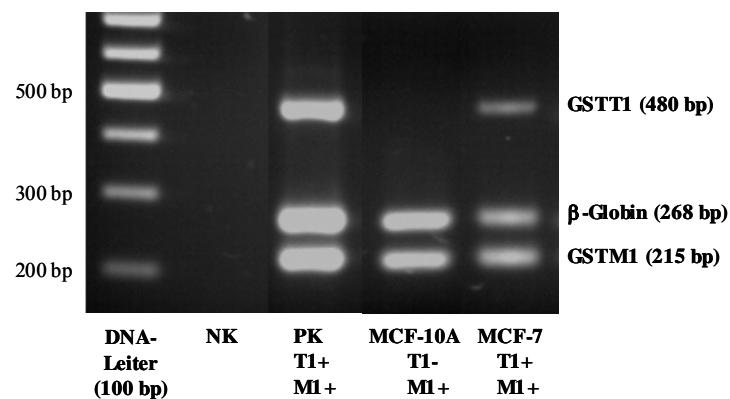


Abbildung 9.9: PCR-Analyse zum Nachweis des *hGSTM1* und *hGSTT1*

Es wurde chromosomale DNA von MCF-10A und MCF-7 untersucht. Als interne Kontrolle wurde das Gen für β -Globin mit amplifiziert. Zum Längenvergleich diente eine 100 bp-DNA-Leiter, als Negativkontrolle (NK) wurde dd H₂O und als Positivkontrolle (PK) DNA von HT29 Kolonzellen eingesetzt. Die Proben wurden in 2 % Agarose aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

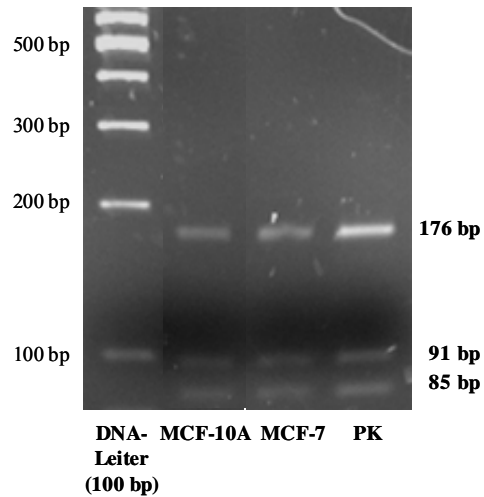


Abbildung 9.10: Restriktionsanalyse eines PCR-amplifizierten DNA-Fragments des *hGSTP1* Gens

Es wurde chromosomale DNA von MCF-10A und MCF-7 untersucht. Zum Längenvergleich diente eine 100 bp-DNA-Leiter, als Positivkontrolle (PK) wurde DNA von LT97 Kolonzellen eingesetzt. Die Proben wurden in 2 % Agarose aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

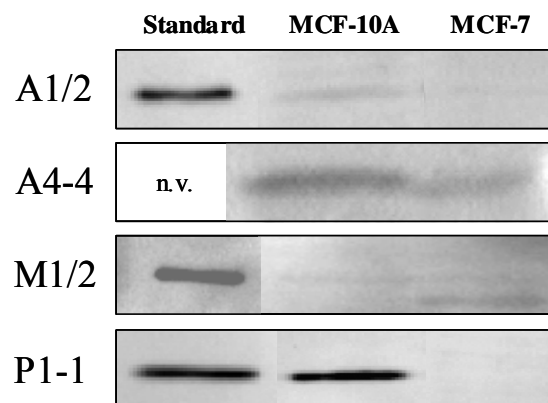


Abbildung 9.11: Beispielblots für den biochemischen Nachweis der Isoenzyme hGSTA1/2, hGSTA4-4, hGSTM1/2, hGSTP1-1 in MCF-10A und MCF-7

n.v., Standard nicht verfügbar

zu 4.5: Modulation Fremdstoff-metabolisierender und oxidativer Stress-assoziiierter Enzymsysteme durch Phytoestrogene in humanen Mammazellen

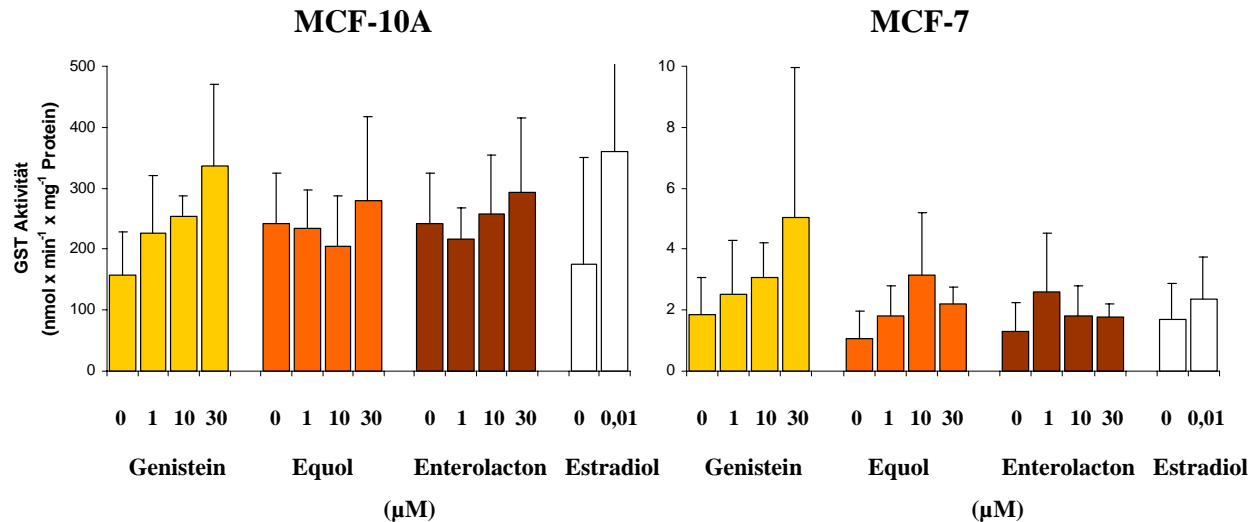


Abbildung 9.12: Induktion der GST-Aktivität auf der Basis des zytosolischen Proteingehaltes in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2

Angaben in MW ± SD, n = 3-4.

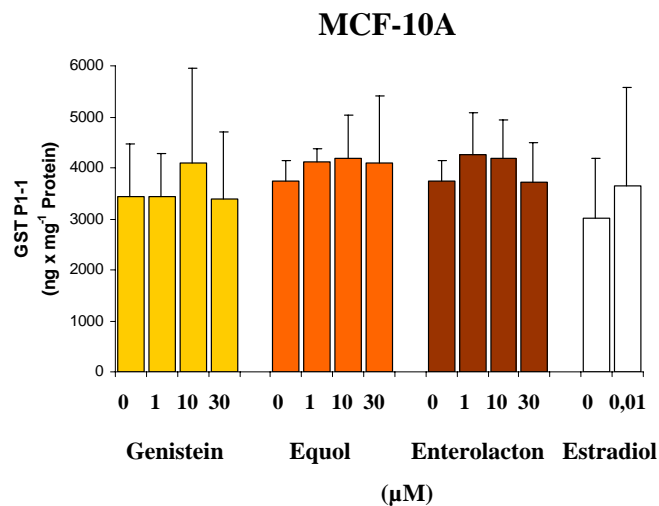


Abbildung 9.13: Modulation der hGSTP1-1 Proteinexpression auf der Basis des zytosolischen Proteingehaltes in MCF-10A nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2

Angaben als MW ± SD, n = 3-5.

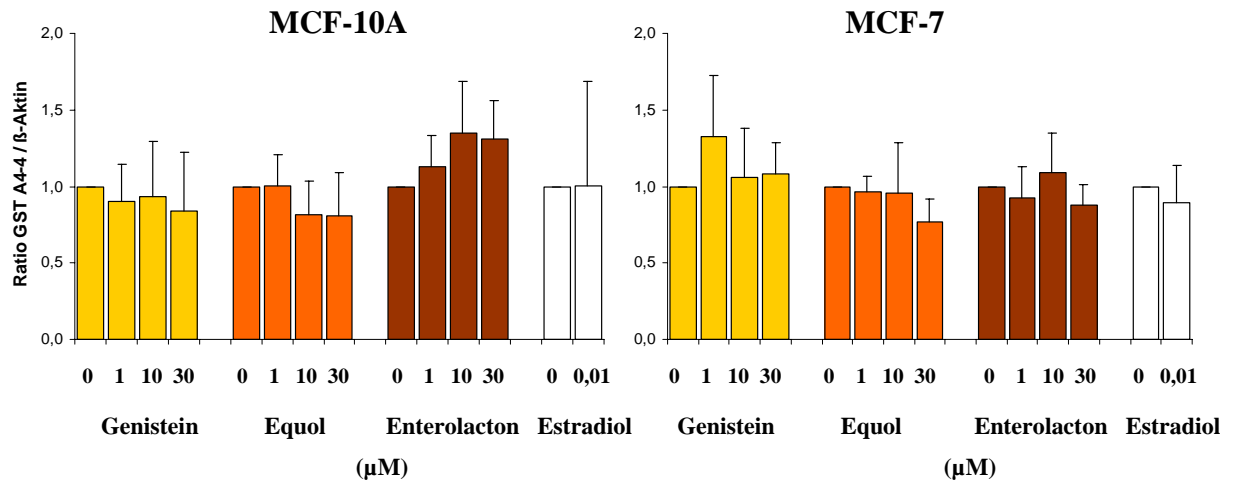


Abbildung 9.14: Modulation der hGSTA4-4 Proteinexpression in MCF-10A und MCF-7 nach 48-stündiger Inkubation mit GEN, EQU, ENL und E2

Angaben als MW \pm SD, n = 3-5.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mir während meiner Promotion unterstützend zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Promotionsthemas und die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation. Ich danke ihr herzlichst für ihre konstruktiven Diskussionen, ihre Anregungen, sowie für ihr Vertrauen, ihr Verständnis und ihre Geduld, die die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten und mich in meiner wissenschaftlichen Persönlichkeit geprägt haben. Weiterhin danke ich ihr, dass sie mir den Forschungsaufenthalt in Coleraine, Nordirland, ermöglicht hat.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie danke ich für die gute Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und die stets gewährte Unterstützung. Ein ganz besonderes Dankeschön geht dabei an meine langjährige Begleiterin Tanja Kautenburger, die mich immer wieder motivieren konnte. Marian danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der gemeinsamen Bearbeitung des Phytoprevent-Projektes. Claudia Lüdtke gilt mein Dank für die Hilfe in bürotechnischen Belangen. Esther, Edda und Eva, Euch danke ich für die technische Unterstützung im Labor.

Mein aufrichtiger Dank gilt Prof. Dr. Ian Rowland und Dr. Pamela Magee der University of Ulster, Nordirland, für die wissenschaftliche Betreuung und Diskussionsbereitschaft während und nach meinem Aufenthalt in Coleraine. In diesem Zusammenhang danke ich auch der EU für die finanzielle Unterstützung über ein Marie Curie Stipendium (HPMT-CT-2001-00287).

Ebenfalls möchte ich mich bei Anja Weise vom Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena für die Karyotypisierung der Zelllinien bedanken. Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Stefan Wölfl danke ich für die Bereitstellung der CCD-Kamera sowie für die wertvolle Hilfestellung bei der Auswertung der Arrays.

Mein Dank gilt auch Dr. Wilbert H.M. Peters vom St. Radboud University Hospital Nijmegen, Niederlande, und Dr. Evan Gallagher der University of Washington, USA, für die Bereitstellung der GST-Antikörper. Der wissenschaftliche Kontakt zu Dr. Gallagher hat aufgrund seiner Erfahrungen auf dem Gebiet der GST-Forschung die Arbeit stark vorangebracht. Frau Prof. Dr. Sabine Kulling und ganz besonders Dr. Corinna Rüfer von der BFEL Karlsruhe danke ich für die Bestimmung der intrazellulären Genisteinkonzentrationen sowie für die Hilfestellung bei der Auswertung der Daten.

Dr. Michael Glei, Nina Habermann, Steffi Klenow, Julia Sauer und Tanja Kautenburger danke ich für das kritische Korrekturlesen der Arbeit und die damit verbundene Mühe.

Mein Dank gilt auch der Kommission des EU-spezifischen Programms “Quality of Life and Management of Living Resources”, welche diese Arbeit innerhalb der Projekte Phytoprevent (QLK-2000-00266) und Phytohealth (QLK1-CT-2002-02453) finanziert hat.

Meinen Eltern Angelika und Reinhard Steiner danke ich ganz besonders für die Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne den Rückhalt meiner Familie hätte ich die nötige Kraft zur Promotion nicht aufbringen können. Matthias gilt der Dank für die zahlreichen Stunden, die zur Aufrechterhaltung meines Computers notwendig waren.

Ganz herzlich möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mir in den letzten Jahren zur Seite standen. Ein besonderes Dankeschön geht an Angela Kriebisch, Sylvie Eichler, Markus Wehlisch, Nadine Knoll und Natja Haag.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter, sowie ohne Verwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt zu haben. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Jena, 7. Dezember 2005

A handwritten signature in cursive script, reading 'Claudia Steiner'.

Claudia Steiner

CURRICULUM VITAE

Claudia Steiner

Diplom-Trophologin

geboren am 30. November 1976

in Eisenach

Ziegenhainer Strasse 25

07749 Jena

ledig

Schul Ausbildung

1983-1991	Polytechnische Oberschule „Otto Grotewohl“ Jena
1991-1995	Staatliches Gymnasium „Caroline Schlegel“ Jena
06.1995	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10.1995-02.2001	Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Diplomarbeit am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie zum Thema: Etablierung einer Methode zur Detektion protektiver antioxidativer Mechanismen durch sekundäre Pflanzenstoffe (Grüntee-Catechine) in humanen Kolon-Zelllinien. Abschluss: Diplom-Trophologin
-----------------	--

Postgraduale Ausbildung

05.2001-07.2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Friedrich-Schiller-Universität Jena am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie
08.2004-12.2004	Marie Curie-Stipendiatin, Forschungsaufenthalt an der University of Ulster, Nordirland
01.2005-03.2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Friedrich-Schiller-Universität Jena am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie

Jena, 7. Dezember 2005



VERÖFFENTLICHUNGEN

M. Glei, M. Matuschek, **C. Steiner**, V. Böhm, C. Persin, B.L. Pool-Zobel (2003). Initial *in vitro* toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. *Toxicology in vitro* 17(5-6):723-9.

Michael Sefkow, Marian Raschke, and **Claudia Steiner** (2003). Enantioselective synthesis and biological evaluation of α -hydroxylated lactone lignans. *Pure Appl Chem* 75(2-3), 273-278.

Aedin Cassidy, Paola Albertazzi, Inge Lise Nielsen, Wendy Hall, Gary Williamson, Inge Tetens, Steve Atkins, Heide Cross, Yannis Manios, Alicja Wolk, **Claudia Steiner**, Francesco Branca (2005). EU Consensus Paper: Critical review of health effects of soy phytoestrogens in postmenopausal women. *Proceedings of the Nutrition Society* 65, 76-92.

Pamela J. Magee, Marian Raschke, **Claudia Steiner**, Julie G. Duffin, Beatrice L. Pool-Zobel, Tuija Jokela, Kristiina Wahala, Ian R. Rowland (2005). Equol: A comparison of the effects of the racemic compound with that of the purified S-enantiomer on the growth, invasion and DNA integrity of breast and prostate cells *in vitro*
Accepted in *Nutrition & Cancer*.

Claudia Steiner, Wilbert H.M. Peters, Evan P. Gallagher, Pamela Magee, Ian Rowland, Beatrice L. Pool-Zobel (2005). Genistein protects human mammary epithelial cells from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and 4-hydroxy-2-nonenal genotoxicity by modulating the glutathione/glutathione S-transferase system.
Submitted in *Carcinogenesis*.

Claudia Steiner, Pamela Magee, Ian Rowland, Beatrice L. Pool-Zobel (2005). Genistein enhances expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase by in mammary epithelial cells: a possible mechanism of dietary breast cancer chemoprevention.
In Vorbereitung.

Claudia Steiner, Corinna E. Rüfer, Sabine E. Kulling, Kristiina Wähälä, Beatrice L. Pool-Zobel (2005). Isoflavones and products formed by the gut flora modulate growth of dysplastic mammary epithelial cells MCF-10A differently than in tumorigenic MCF-7 cells.
Eingereicht bei *Eur J Cancer*.

Genistein protects human mammary epithelial cells from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and 4-hydroxy-2-nonenal genotoxicity by modulating the glutathione/glutathione S-transferase system

Claudia Steiner¹, Wilbert H.M. Peters², Evan P. Gallagher³, Pamela Magee⁴, Ian Rowland⁴, Beatrice L. Pool-Zobel^{1,*}

Epidemiological studies have shown that ingestion of isoflavone-rich soy products is associated with a reduced risk for the development of breast cancer. In the present study, we investigated the hypothesis that genistein modulates the expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human breast cells, thus conferring protection towards genotoxic carcinogens which are GST substrates. Our approach was to use human mammary cell lines MCF-10A and MCF-7 as models for non-neoplastic and neoplastic epithelial breast cells, respectively. MCF-10A cells expressed hGSTA1/2, hGSTA4-4, hGSTM1-1 and hGSTP1-1 proteins, but not hGSTM2-2. In contrast, MCF-7 cells only marginally expressed hGSTA1/2, hGSTA4-4 and hGSTM1-1. Concordant to the protein expression, the *hGSTA4* and *hGSTP1* mRNA expression was higher in the non-neoplastic cell line. Exposure to genistein significantly increased *hGSTP1* mRNA (2.3-fold), hGSTP1-1 protein levels (3.1-fold), GST catalytic activity (4.7-fold) and intracellular glutathione concentrations (1.4-fold) in MCF-10A cells, whereas no effects were observed on GST expression or glutathione concentrations in MCF-7 cells. Preincubation of MCF-10A cells with genistein decreased the extent of DNA damage by 4-hydroxy-2-nonenal (150 μ M) and benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (50 μ M), compounds readily detoxified by hGSTA4-4 and hGSTP1-1. In conclusion, genistein pretreatment protects non-neoplastic mammary cells from certain carcinogens that are detoxified by GSTs, suggesting that dietary-mediated induction of GSTs may be a mechanism contributing to prevention against genotoxic-injury in the etiology of breast cancer.

Genistein enhances expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase in mammary epithelial cells: a possible mechanism of dietary breast cancer chemoprevention

Claudia Steiner¹, Pamela Magee², Ian Rowland², Beatrice L. Pool-Zobel^{1,*}

Genistein, a major phytoestrogen, may reduce risks for developing breast cancer. A potential mechanism of cancer chemoprotection is the induction of detoxifying phase II-enzymes, such as NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1). NQO1 detoxifies carcinogenic quinones arising from estrogen-metabolism, a potential risk factor for breast cancer. The present study examined whether genistein induces the expression of NQO1 in mammary cells and thus contributes to chemoprevention. We used the human mammary cell lines MCF-10A and MCF-7 as models for non-neoplastic and neoplastic epithelial cells, respectively. Following genistein treatment cellular NQO1 expression on mRNA, protein and activity levels was assessed and protection against menadione-induced genotoxicity was evaluated. Both cell lines express hNQO1 with a 3-fold higher steady-state mRNA expression in MCF-7 than MCF-10A cells. Exposure to genistein (48 h) significantly increased *hNQO1 mRNA* (30 µM, 2.0-fold), protein expression (30 µM, 3.4-fold) and NQO1 activity (10 µM, 30 µM, 1.5-fold) in primary-like MCF-10A cells, whereas no effects were observed on NQO1-1 expression or activity in MCF-7 cells. Preincubation of MCF-10A, but not MCF-7 cells, with genistein suppressed menadione-induced DNA damage. In conclusion, genistein treatment protects non-neoplastic mammary cells from genotoxic actions of menadione by enhancing NQO1 detoxification system. This suggest that dietary-mediated induction of NQO1 may be a mechanism contributing to prevention against reactive quinone related breast cancer in humans.

Isoflavones and their bacterial metabolites modulate growth of dysplastic mammary epithelial cells MCF-10A differently than in tumorigenic MCF-7 cells

Claudia Steiner¹, Corinna E. Rüfer², Sabine E. Kulling³, Kristiina Wähälä⁴, Beatrice L. Pool-Zobel¹ *

The soy isoflavones, genistein and daidzein, are transformed by the colonic microflora to metabolites with biological activities. Genistein is converted to dihydrogenistein and subsequently to 6-hydroxy-*O*-desmethylangolensin, whereas daidzein is reduced to dihydrodaidzein and further metabolized to *O*-desmethylangolensin and equol. In this study, biological effects of these metabolites were compared for the first time with effects of parent compounds using non-tumorigenic MCF-10A and tumorigenic MCF-7 breast cells. Cell growth and metabolic activity were studied using fluorometric and colorimetric assays. Cellular uptake of genistein was measured using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Genistein markedly decreased growth of primary-like estrogen receptor negative (ER(-)) MCF-10A cells at concentrations $\geq 20 \mu\text{M}$ and increased growth of tumorigenic ER positive (ER(+)) MCF-7 cells at low concentrations (0.1-20 μM). However, the bacterial metabolites of genistein modulated growth to a lesser extent compared to the parent compound. Daidzein-related compounds had similar patterns of responses, for this group the metabolite equol was the most active. Genistein (10 μM , 24 hours) was absorbed to a higher degree by MCF-10A than by MCF-7 cells, resulting in intracellular concentrations of 195 μM and 37 μM , respectively. The intracellular uptake was associated with a reduced metabolic activity in MCF-10A but not in MCF-7 cells.

In summary, genistein treatment of ER(-) MCF-10A cells resulted in high cellular concentrations that were associated with impaired metabolic activity and inhibition of cell growth. In contrast, ER(+) MCF-7 cells absorbed genistein to a lesser degree and were stimulated to grow at low concentrations, confirming ER dependent mechanisms for action. Thus, individual bacterial metabolites of genistein show biological activities to a lesser extent than the parent compound, whereas those of daidzein, namely equol, exert higher activities. Depending on the type of target cells, soy isoflavones result in biological effects which either indicate mechanisms of chemoprotection or of enhanced tumor progression.

TAGUNGSBEITRÄGE

25. – 28.08.2004	XXII. International Conference on Polyphenols, Helsinki (Finland) Poster
11. – 12.03.2004	41. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., Freising-Weihenstephan Präsentation der Forschungsergebnisse
04. – 07.02.2004	PHYTOHEALTH network meeting: Improving health through dietary phytoestrogens: A pan-European network on consumers' issues and opportunities for producers
12. – 14.10.2003	8 th Karlsruhe Nutrition Congress: Phytoestrogens: Benefits and Risks for Human Health, Karlsruhe Poster
09.05.2003	1. Arbeitstreffen des DFG-Verbundforschungsprogrammes „FlavoNet“, Heidelberg Präsentation der Forschungsvorhaben innerhalb des Verbundprogrammes
2001 - 2004	Regelmäßige Arbeitstreffen im Rahmen des EU-Projektes „Phytoprevent“ Präsentation und Diskussion der Forschungsergebnisse
14. – 15.03.2001	38. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., Jena Vorstellung der Ergebnisse der Diplomarbeit